基　金　项　目

犬干细胞系列产品的研发与应用
（2017530117000288）



摘要

目的：骨关节炎是一种常见的慢性退行性疾病，采用碘乙酸钠复刻骨关节炎模型，观察常规治疗药物维他昔布和骨髓间充质干细胞（Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells,BMSCs）治疗对骨关节炎疗效相比较，为临床治疗骨关节炎提供理论依据和技术支持。

方法：将12只中华田园犬随机成4分组（n=3），3只阴性（NC）对照组，3只BMSCs治疗组，3只常规治疗组，3只阳性（PC）对照组。每组犬按照碘乙酸钠2.0 mg/kg用1 ml生理盐水稀释关节腔内注射，每4天注射一次，PC对照组关节腔注射同等剂量的生理盐水，每只犬注射的骨髓间充质干细胞的数目为1×10^7个骨髓间充质干细胞混悬液。试验期间记录各组实验犬只各项数据变化，抽取血液进行血常规检测以及cCRP炎症检测、DR观察软骨恢复情况。实验结束后采集关节软骨样本用4%多聚甲醛组织固定液固定，做关节软骨切片和HE染色，观察关节软骨的恢复情况。

结果：碘乙酸钠造模成功后，手术打开犬膝关节发现犬膝关节软骨肉眼可见的骨赘生物明显，软骨出现明显裂缝，滑车沟内软骨破损严重，髌骨表面不光滑。体温显示，PC组与BMSCs治疗组相比较：2d时BMSCs治疗组极显著低于PC组体温（$P<0.01$），26d时BMSCs治疗组极显著低于PC组体温（$P<0.01$），28d时BMSCs治疗组极显著低于PC组体温（$P<0.01$）。PC组与常规治疗组相比较：27d时常规治疗组极显著低于PC组体温（$P<0.01$）。血常规检测中与PC组相比较：BMSCs组和常规药物组的WBC 10d、30d、40d极显著低于PC组（$P<0.01$）；与PC组相比较：BMSCs组和常规药物组的RBC在10d时极显著高于PC组（$P<0.01$）；40d时BMSCs组RBC极显著高于PC组（$P<0.01$）。与PC组相比较：BMSCs组和常规药物组极显著低于PC组PLT（$P<0.01$）。关节炎OA评分指数中与PC组相比较：BMSCs组和常规治疗组极显著低于PC组（$P<0.01$），BMSCs组与常规治疗组相比较：在20d时BMSCs组显著低于常规治疗组（$P<0.05$）。cCRP结果检测中与PC组相比较：PC组极显著高于BMSCs组和常规治疗组（$P<0.01$），BMSCs组与常规治疗组相比较：显示为差异不显著。

DR观察后发现，经过治疗，髌骨腹侧与滑车脊低密度间隙增加，提示髌骨腹侧与滑车脊中间软骨继续生长，膝关节缺失的骨皮质恢复，胫骨髁关节骨密度基本恢复正常。HE染色后发现，关节软骨出现明显的软骨基质降解以及软骨组织丢失。经治疗，BMSCs组和常规治疗组都不同程度的减轻了软骨细胞和软骨基质的丢失。

结论：BMSCs具有明显的抗炎修复作用，可明显减轻 OA 犬只的关节炎症，改善关节软骨损伤，常规药物维他昔布对于OA的治疗在镇痛降温上效果优于BMSCs，但是在对于修复软骨细胞，促进软骨细胞再生的速度上BMSCs优于常规药物治疗。

关键词：犬；骨髓间充质干细胞；维他昔布；退行性骨关节炎；碘乙酸钠

Clinical effect of canine bone mesenchymal stem cells on canine degenerative arthritis

Niuwei

Directed by Prof. Yulin Yan

Abstract

OBJECTIVE: Osteoarthritis is a common chronic degenerative disease, Osteoarthritis model was reconstructed with sodium iodoacetate, To observe the comparison of the efficacy of conventional treatment drugs Vitoxib and bone marrow mesenchymal stem cells in the treatment of osteoarthritis, so as to provide theoretical basis and technical support for clinical treatment of osteoarthritis.

METHOD: Twelve Chinese Rural dogs were randomly divided into 4 groups (n=3), 3 negative (NC) control group, 3 BMSCs treatment group, 3 conventional treatment group and 3 positive (PC) control group. Canine in each group were injected intra articular cavity with 1 ml normal saline diluted with sodium iodoacetate 2.0 mg/kg, once every 4 days, The PC control group was injected with the same dose of normal saline into the articular cavity, and the number of bone marrow mesenchymal stem cells injected into each dog was 1×10^7 bone marrow mesenchymal stem cell suspensions. During the experiment, the data changes of experimental dogs in each group were recorded, and blood samples were taken for routine blood test, cCRP inflammation test and DR observation of cartilage recovery. At the end of the experiment, the articular cartilage samples were collected and fixed with 4% paraformaldehyde tissue fixating solution. The articular cartilage slices were made and HE staining was performed to observe the recovery of the articular cartilage.

RESULTS: After the successful modeling with sodium iodoacetate, the surgical opening of the canine knee joint revealed obvious osteophytes visible to the naked eye,

obvious cracks in the cartilage, serious cartilage damage in the trochlear groove, and uneven surface of the patella. Body temperature showed that compared with the BMSCs treatment group, the PC group: The body temperature of the BMSCs treatment group was significantly different from that of the PC group at 2d ($P<0.01$); the body temperature of the BMSCs treatment group was significantly different from that of the PC group at 26d ($P<0.01$); and the body temperature of the BMSCs treatment group was significantly different from that of the PC group at 28d ($P<0.01$). Comparison between the PC group and the conventional treatment group: 27 days after the conventional treatment group was lower than the PC group, the difference in body temperature was extremely significant ($P<0.01$). Compared with PC group, WBC 10d, 30d and 40d in BMSCs group and conventional drug group were significantly lower than those in PC group ($P<0.01$). Compared with PC group, RBC of BMSCs group and conventional drug group was higher than that of PC group at 10 days, showing a very significant difference ($P<0.01$). At 40 days, BMSCs group was significantly higher than PC group ($P<0.01$). Compared with PC group, the PLT of BMSCs group and conventional drug group was significantly lower than that of PC group ($P<0.01$). Compared with PC group, OA score index of arthritis in BMSCs group and conventional treatment group was significantly lower than that in PC group ($P<0.01$); compared with conventional treatment group, BMSCs group was significantly lower than that in conventional treatment group at 20 days ($P<0.05$). Compared with the PC group, the difference of cCRP results between the BMSCs group and the conventional treatment group was extremely significant ($P<0.01$), while the difference between the BMSCs group and the conventional treatment group was not significant.. DR Observation showed that after treatment, the low-density space between ventral patella and trochlear ridge increased, suggesting that the middle cartilage of ventral patella and trochlear ridge continued to grow, The missing cortex of knee joint was restored, and the bone density of tibial condylar joint was basically restored to normal, HE staining showed obvious degradation of cartilage matrix and loss of cartilage tissue, After treatment, the loss of chondrocytes and cartilage matrix

was reduced in both the BMSCs group and the conventional treatment group.

CONCLUSION: BMSCs have obvious anti-inflammatory repair effect, which can significantly reduce joint inflammation and improve articular cartilage injury in OA dogs, The efficacy of conventional drug Vitoxib in the treatment of OA is better than BMSCs in analgesia and cooling, but BMSCs is better than conventional drug therapy in repairing chondrocytes and promoting the regeneration of chondrocytes.

Key words: dog; Bone marrow mesenchymal stem cells; Vitaxib; Degenerative osteoarthritis; Sodium iodoacetate

目录

符号及缩写语说明

缩写	英文名称	中文名称
MSCs	Mesenchymal stem cells	间充质干细胞
SCs	Stem cells	干细胞
BMSCs	Bone mesenchymal stem cells	骨髓间充质干细胞
AD-MSCs	Adipose-derived mesenchymal stem cells	脂肪间充质干细胞
PMSCs	Placenta placental mesenchymal stem cells	胎盘间充质干细胞
TLR	Toll-like receptors	Toll 样受体
TNF-α	Tumor necrosis factor-α	肿瘤坏死因子α
IFN-γ	Interferon-γ	干扰素γ
IL-1β	Interlenkin-1	白细胞介素-1β
OA	Ostarthritis	骨关节炎
NSAIDs	Nonsteroidal anti inflammatory drugs	非甾体类药物
HA	Hyaluronic acid	透明质酸
PRP	Platelet rich plasma	富血小板血浆
IDO	Indole 2 3 dimethoxase	吲哚胺 2,3-二加氧酶
TGF-β	Transformational growth because-β	转化生长因子β
PGE2	Prostaglandin E2	前列腺素 E2
NK	Natural killer cell	NK 细胞
CRP	C-reactive protein	C 反应蛋白
WBC	White Blood Cell	白细胞
RBC	Red Blood Cell	红细胞
Lym#	Lymphocyte	淋巴细胞
Neu#	Neutrophils	中性粒细胞
PLT	Platelet	血小板
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
HLA	Human Leucocyte Antigen	人类白细胞抗原
HLA-DR	Human Leucocyte Antigen DR	人类白细胞 DR 抗原
MMPs	Matrix Metalloproteinases	基质金属蛋白酶
NF-κB	Nuclear factor kappa-B	核因子κB
PRP	Platelet-rich plasma	富血小板血浆
PDGF	Platelet derived growth factor	血小板衍生生长因子

1. 前言

间充质干细胞（mesenchymal stem cells, MSCs）是来源于中胚层，MSCs是能够有自我分化和细胞更新的多能内源性干细胞，并且MSCs能够从全身多种组织或器官中（如胎盘、骨髓脐带血）中分离得到[1-2]MSCs在应用于动物体内后会迁移到身体受损部位并分化成细胞系来修复组织或器官的能力被称为归巢性。同时，MSCs具有较低的免疫原性，能够抑制抗原细胞成熟，降低T细胞的反应，也不会引起淋巴细胞的增殖[3]，能够用于HLA配型不一致的异体间移植[4]，避免胚胎干细胞移植中的伦理和免疫排斥问题。间充质干细胞较易获得，具有很大的增殖能力，并且可以在体内分化成许多不同的细胞类型，MSCs用于培养分化软骨细胞是一个较为实用的研究方向[5]。间充质干细胞已用于人类和兽医的各种应用。对于软骨病变研究，狗是一种特别独特的动物物种，因为它们可以作为试验动物模型，人类医学的临床模型和治疗对象[6]。骨关节疾病在犬中尤其常见，因此，MSCs是最理想的治疗细胞[7]。

总之，MSCs在临床应用中还需要更加深入的学习MSCs的基础知识和更加广泛的研究才能更好的应用于实际生活中。

1.1 间充质干细胞概述

干细胞（Stem Cells,SCs）是不同分化阶段的异质性细胞群，可分化成多种细胞，在不同的培养条件下，SCs能分化为肌上皮细胞、骨细胞、软骨细胞、多巴胺能神经元和乙酰胆碱能神经元等[8-9]，在医学界称之为“万用细胞[10]。SCs有修复和替代受损细胞和死亡细胞的功能，可以迁移到相应的损伤的细胞处或病灶，替换死亡或受损的细胞，并直接修复受损的组织。干细胞具有较强的旁分泌作用，能分泌出集体所要求的各种神经营养因子和抗凋亡因子，参加血管生长、骨骼修复、造血调节、激活神经，提高各种身体机能[11]，能激活体内和抑制状态干细胞，增加生物体内干细胞的数量，恢复干细胞的初始质量，使其重新恢复正常的功能[12]。SCs能够促进细胞间的电能力、电传导恢复，比如成体干细胞中有一种干细胞称之为间充质干细胞，其能促进电离子通道的开放，分泌链接蛋白帮助细胞连接。SCs又可以分为胚胎干细胞（embryonic stem cells)和成体干细胞(adult stem

cell)，胚胎干细胞是一种高度未分化的细胞[13]， 可分化为体内多中细胞类型，是一种全能性的细胞，几乎能够分化为全部组织和器官；成体干细胞是具有多向分化能力的未分化细胞。具备干细胞特性的原细胞之所以残留在皮肤、脂肪、骨髓、脐带、胎盘等部位，是因为原细胞具有自我分化和多能性。成体干细胞与胚胎干细胞相比，成体干细胞分化能力较弱，通常分化为胰腺、肝脏、皮肤组织、肌肉、心肌细胞等特定的组织或脏器[14]。

MSCs 来源于中胚层间充质，包含一群具有多功能性的异质群体，可以从脐带、脂肪、胎盘、骨髓、牙髓、外周血等多种组织分离到[15]。后续研究证明 MSCs 可以从滑膜、骨、肌肉、肺、肝脏、胰腺等组织以及羊水和脐带血中分离和制备间充质干细胞[16]。来自骨髓的间充质干细胞是最常见的。然而，来自骨髓的间充质干细胞存在以下问题:随着年龄的增长，干细胞数量显著减少，增殖分化能力显著下降;制备过程不易控制质量;同种异体移植可能产生免疫反应;如在取样过程中对患者有损伤，当患者患有骨髓疾病时也不能采取骨髓，即使是最强壮的动物也不应该抽取太多的骨髓用于制备间充质干细胞[17]。所以这些都限制了骨髓间充质干细胞的临床应用，使寻找骨髓以外的间充质干细胞来源成为一个主要问题。

现在认为 MSCs 具有跨系多向分化的能力，培养周期短，细胞增殖速度快，且在临床使用时不需要抗原匹配[18-19]。现在 MSCs 的体外培养技术已经很成熟，针对其增殖的培养基种类也很多，均可以维持 MSCs 的成倍数增长。有实验结果表明，MSCs 在液氮中冻存 20 多年后复苏仍具有干细胞的一切特性，保存时间较长。

判定符合 MSCs 的标准为:具有粘附能力细胞能够贴壁生长;细胞表面标记:CD105、CD73、CD90 的表面抗原标志物的表达阳性率大于 95%[20]；对 CD34、CD14、CD11b、CD79 表达率小于 2%和 HLA-DR 呈阴性[21]；以及能够分化为软骨、成骨、脂肪细胞的能力。在美国最新的(2021 年)NIH 数据库有研究调查显示了大约 1200 项临床研究间充质干细胞的相关项目是经过注册的。正因为 MSCs 具有自我更新和多向分化的潜力、来源相对容易且广泛、免疫原性低、以及“有目的”的迁移到相应的损伤的细胞处或病灶，替代死亡、或损伤的细胞，直接起到修复损伤组织的作用能力[22]。在过去的几十年的摸索中，发现 MSCs 在疾病治

疗中发挥的旁分泌作用和机体的免疫调节作，可使其在机体中通过全身性功能恢复机体稳态。在实验治疗中，无论是自体间充质干细胞还是异体间充质干细胞在分离培养后都能够通过静脉注射或局部注射应用于患者(Zhuang 等人)[23]。已有众多临床实验数据能够证明间充质干细胞在治疗和实验中的安全性和有效性(Wang 等人)[24]。因此 MSCs 成为再生医学、组织器官移植和治疗免疫相关疾病的理想细胞。

1.2 间充质干细胞来源

1.2.1 骨髓间充质干细胞

常用的骨髓间充质干细胞（Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells,BMSCs）分离方法有，密度梯度离心法、组织消化法、免疫磁珠分选法、全骨髓贴壁法，较为常用的是密度梯度离心法，分离出的细胞纯度较高，操作步骤简便[25]。组织消化法在操作的过程中步骤复杂，在实验中容易出现污染，实验过程耗时比较短，且需要对消化酶的选择和消化时间有严格的控制，优点是可以最大降低对动物伤害并且获取得大量细胞。适合做一些周期性较短的实验，例如药物测试、细胞分化等实验研究；免疫磁珠分选法是目前分离细胞纯度最高的方法，但由于技术较为先进精良，磁珠价格昂贵[26]，一般不用于简单的试验研究；全骨髓贴壁法价格较低，且操作简单，但分离出的细胞成分比较杂，需要进一步的纯化鉴定，此方法较为常用；密度梯度离心法分离出的干细胞纯度较高，对细胞的伤害性不高，细胞活性较高，且操作简单，价格低廉，是目前分离 BMSCs 最为常用的一种方法[27]。

骨髓间充质干细胞分离自骨髓，可用活检针以刺入从犬的股骨近端、髋骨结节或肱骨近端中获取，该方法采取骨髓用于做 BMSCs 的优点在于对动物机体损害小，取材较方便。BMSCs 与其他来源的间充质干细胞相比较，BMSCs 分化潜能更加突出[28]。骨髓是形成身体血液的组织，在成年动物中有两种骨髓：红骨髓和黄骨髓。红骨髓负责制造各种白细胞、红细胞和血小板，白细胞能杀灭与抑制各种病原体。因此，骨髓不但是造血器官，它还是重要的免疫器官[29]。骨髓是在长骨的骨髓腔和扁平骨的薄骨质之间的网眼中发现的，是一种海绵状组织。产生血细胞的骨髓颜色发红叫红色骨髓，出生时红色骨髓填满全身骨髓腔。随着年龄

的增长，脂肪细胞增加，红色骨髓部分被黄色骨髓代替，最后只有几乎扁平的骨髓腔里才有红色骨髓[30]。骨髓基质系统内存在的骨髓间充质干细胞是一种除造血干细胞以外的、具有高度自我更新能力和多向分化潜能的干细胞，可以向骨、软骨、肌组织、皮肤、脂肪、神经等多种组织分化，因此可以作为组织工程中的种子细胞。在骨髓中，BMSCs 占骨髓有核细胞总数的 0.001%-0.1%，含量极低[31]。骨髓间充质干细胞的体外培养条件要求较高，在培养过程中，受贴壁时间、种植密度、血清含量、培养温度和培养基 pH 值等条件的影响[32]。

1.2.2 脂肪间充质干细胞

脂肪间充质干细胞(adipose-derived mesenchymal stem cells，AD-MSCs).来源于动物体中的脂肪[33]而成的组织。脂肪细胞被松散的结缔组织的薄层分离成小叶。储存的脂肪根据需要迅速分解成甘油三酯和脂肪酸，通过血液运送到组织中使用。它们影响胰岛素敏感性、血压、内皮功能、纤维溶解活性和炎症反应，并参与许多重要的病理生理学过程[34]。脂肪组织从纯粹的能量储存器官进化为非常重要的内分泌系统。脂肪组织中也存在一些干细胞群，具有自我更新能力和多向分化潜能，被称为脂肪组织来源的间充质干细胞，简称脂肪间充质干细胞。脂肪组织分离得到脂肪间充质干细胞以梭形为主要形态[35]，BrdU 可标记其细胞核[36]。通过胶原酶消化法可以从得到的脂肪组织里获取脂肪间充质干细胞，脂肪组织可以过常规手术方法切取、抽取脂肪或活检得到脂肪组织[37]。AD-MSCs 已被证明具有广泛增殖能力和分化为多个细胞谱系能力的细胞群。因此 AD-MSCs 原材料获取方便、对动物体创伤小、获取的细胞数量多和增殖能力强的特点，在干细胞移的临床应用中有广阔的前景[38]。与骨髓间充质干细胞类似，在来源、细胞群特点以及分化潜能等多方面极为相似 AD-MSC 也来源于胚胎间充质，并具高增殖和多向分化的潜能，脂肪间充质干细胞更易获得足够数量的细胞，且获取过程中对机体损伤更小，是更为理想的自体干细胞源[39]。De Ugarte 等人[40]通过系统的比较研究确定了当 AD-MSCs 和 BMSCs 来源于同一个体时，AD-MSCs 和 BMSCs 在干细胞产量、细胞衰老、生长动力学、多向分化潜能和转染外源基因效率上无显著差异。

1.2.3 胎盘间充质干细胞

胎盘间充质干细胞（Placenta placental mesenchymal stem cells，PMSCs）的

主要来为脐带血、脐带、羊水和羊膜。因胎儿在正常生产后，胎盘通常当做医疗废弃物丢弃，因此，用脐带血、脐带、羊水和羊膜等提取制作胎盘间充质干细胞没有伦理道德限制、具有无创性而且来源广泛[41]。

脐带血是胎儿娩出后，脐带结扎并离断后残留在胎盘和脐带中的血液，其中包含造血干细胞、间充质干细胞、内皮祖细胞等许多具有再分化功能的细胞，这也是脐带血的珍贵之处所在[42]。随着生命的发育，我们的许多细胞都会从具有多种分化能力的状态分化为成熟细胞，成熟细胞的命运就是兢兢业业的工作，然后衰老死亡。脐带来源的 MSCs 的体外培养常用于酶消化法和组织块贴壁法[43]。

1.3 间充干细胞质的特性

1.3.1 间充质干细胞的免疫调节

当免疫系统活力不够无法对炎症做出正确反应时，间充质干细胞可以促进炎症反应，当免疫系统被过度激活时，间充质干细胞可以抑制炎症避免免疫系统的自我攻击[44-45]。MSCs 会表达 TLR2，TLR3，TLR4，TLR7 和 TLR9[46]。而这些 TLR 的表达水平根据其组织来源而显着变化。可以通过 TLR（Toll 样受体）感知不同的危险信号。TLR 识别来自受伤细胞或病原体的分子，作为免疫防御系统的第一线。TLR 激活可以进一步刺激免疫细胞和 MSCs.活化的 MSCs 对 TLR 配体作出反应并释放抗炎因子[47]。因此，TLR 在 MSCs 的感知和切换免疫反应中起着重要作用。同种异体 MSCs 将被 NK 细胞缓慢消除[48]。然而，一旦 MSCs 通过 TLR3 配体被激活，它们就可以被 NK 细胞从这种清除过程中逃脱。TLR（TLR3 或 TLR4）活化的类型也可以诱导 MSCs 的促炎或抗炎表型[49]。

1.3.2 间充质干细胞的免疫抑制

刺激不足的免疫系统无法保护宿主。然而，过度刺激会攻击宿主的健康细胞和组织，导致组织或器官破坏。因此，免疫反应必须通过不同的途径得到严格调节。几个细胞群已被证明可以防止免疫系统过度刺激，包括自然和诱导的 $CD4^+$ Treg（T 调节细胞）[50]、$CD8^+$ Treg[51]、Breg（调节性 B 细胞）[52]、M2 巨噬细胞[53]和抑制性树突状细胞[54]。这些细胞通过分泌抑制细胞因子（如 IL-10、TGF-β、IL-35）、抑制配体和受体（如 PD-1 和 PD-L1），并通过直接调节免疫细胞分化、

成熟和生存来调节免疫反应。事实证明，MSC 也代表了一种防止免疫系统过度刺激的细胞[55]。MSCs 的免疫抑制活性主要受到促炎因素的刺激，如 IFN-γ（干扰素γ）、TNF-α（肿瘤坏死因子α）和 IL-1β（白细胞介素-1β）。在这些因素中，IFN-γ对 MSCs 的免疫抑制功能更为重要[56]。

1.4 骨关节炎

关节软骨对于正常活动是不可缺少的。软骨可以作为滑膜的避震器和润滑剂，因为它可以承受很高的重复负荷，并且可以将关节表面的摩擦降到最低。但是关节软骨依然会受到急性外伤、变性、关节疾病等各种因素的损伤[57]。一旦受损，由于血管和淋巴的状态，关节软骨表现出非常有限的内在修复能力。未修复的软骨缺陷会导致疼痛、肿胀、可动性下降，最终发展为骨关节病(OA)[58]。骨关节炎是一种常见的关节病变疾病，属于退行性疾病以及骨质异常的增生，它会导致病患的关节软骨受损甚至波及到整个关节面。软骨下骨的损坏，韧带弹性减弱、老化，关节囊肿胀，滑膜的病变以及关节周围的肌肉出现病变等情况。OA 是人和狗共同的退行性、伴有进行性疼痛的疾病。但是，修复软骨病变的合适的治疗方法还没有确立。在人类医学中，有微小骨、骨软骨自体移植、自体软骨细胞移植等各种各样的外科介入[59]。微骨折后，再生的组织表现为混合纤维软骨组织，其机械性能低于天然透明质酸软骨，且长期转归较差。同样，骨软骨自体移植在移植的可用性和捐赠者部位的疾病风险上都有限制。软骨细胞的自体移植虽然可以修复透明质软骨，但是存在单层培养下软骨细胞表型丧失、软骨细胞的可利用性有限、软骨细胞增殖效果不足等问题[60]。

1.4.1 骨关节炎的病因

年龄、体重、关节损伤、炎性因子的增多、遗传等因素都会造成骨关节炎症的发生。研究表明，老年犬患 OA 的几率是远高于年轻犬，5 岁以上的犬约有 50%患上 OA，10 岁以上的犬约有 95%患上 OA。[61-62]通过将老年患病动物的关节软骨分离出来进行体外细胞培养后可以发现，因为关节软骨的退化，在关节软骨上的基质金属蛋白酶(（matrix metalloproteinases MMPs)明显增加[63],另外对于软骨细胞来说，软骨细胞自身的修复力减弱是细胞开始出现衰弱的一个明显标志[64-65]。目前，无论是人还是犬，肥胖都是已被认为会造成 OA 的一个危险因素[66]，肥胖

者体内的激素水平会出现异常从而导致软骨细胞自身的代谢出现异常，第二是大体重者关节需要承受更多的压力，因此超正常体重者会比正常体重者更容易患OA。另外，过多的脂肪细胞会导致脂肪因子的过多分泌[67]，脂肪因子在 OA 的疾病发展过程中会起到关键作用，导致 IL-1β、IL-6、IL-8、TNF-α过多从而激活NF-κB 信号通路，刺激软骨细胞的加速分解代谢[68]。关节的创伤也是 OA 的常见类型，通过外力因素导致关节软骨、半月板的损伤，或者韧带的撕裂，关节脱位等对关节造成了负面的影响[69-70]，炎性因子的增加激活了 NF-κB 信号通路[71]，让受损软骨细胞产生高氧活性物质使细胞核线粒体受损因此软骨细胞自我修复活性大大降低从而成为退行性关节炎。另外有大量流行病学研究调查表明遗传因素在 OA 发病中具有重要作用[72-73]。

1.4.2 骨关节炎的症状

跛行或步态异常是患有关节疾病犬只的特征，如创伤性或者发育不良性关节疾病所表现的骨关节炎一般只会累及单个关节，这种情况会造成患肢长时间的持续跛行。长期表现出轻度不适亦或是不愿意运动的，且没有全身疾病是退行性关

表 1-1 犬常见关节疾病分类

Table 1-1 Classification of common joint diseases in dogs

非炎症性关节疾病	炎症性关节疾病
退行性	感染性
创伤性	非感染性（免疫介导性）
发育性	非侵蚀性
肿瘤性	侵蚀性

节病 的典型症状，虽然全身多个关节会受到影响，但疾病症状发生相对缓慢。炎性关节炎为动物出现关节患处肿胀发红、不愿意运动不给触摸患处，引起的疼痛远远比退行性关节炎更为强烈强制移动或触碰后会尖叫。患有多关节炎的犬通常会有交替跛行的症状，但也有一些病例没有明显的跛行,而仅出现食欲减退、发热、虚弱、僵硬或运动不耐受的非特异性病史。临床上,多关节炎患犬通常有持续性或周期性发热。一些患有多关节炎的动物没有明显的关节疼痛或可察觉的关肿胀及渗出,因此对这种疾病应保持高度警惕。

1.4.3 骨关节炎的诊断

X 光检查

能够显示全身大部分的关节以及软骨的发育情况，方便观察关节缝隙是否正常，也可找到一些软组织结构的疾病问题所在。在拍摄 X 线扫描时可根据需要调整患犬体位。

B 超检查

患犬需要仰卧，通过 B 超探头来扫描关节，通过扫描关节周边观察关节积液情况与关节软骨的连续性。

血液检查

通过血液检测可以初步判定是属于炎症性关节疾病还是非炎症性关节疾病，也可推断是否有出类风湿因子以及自身免疫介导性关节炎的抗体。

MRI 检查

选择相关的小型动物关节扫描序列和关节线圈对患犬进行 MRI 扫描，查看患犬关节积液、炎症、软骨新生情况以及周边结构影像情况。

关节镜检查

关节镜检查通过头部的一个微型摄像机进入需要探查的关节腔内来检查关节内部构造，可以清晰的观察到软骨、半月板、韧带、滑膜、关节液有无病变，关节镜可以看到 X 射线无法显示的软骨变化，关节镜技术为骨关节炎提供了更加详细可靠的诊断依据。

1.5 骨关节炎的治疗

1.5.1 加强功能锻炼

患骨关节炎的犬应该避免过多的负重，同时对宠主加强科普教育非常必要。需要改变宠主的观念，倡导宠主给犬只健康的生活方式。尽量避免过多的爬楼，长时间的走路、跑步，跑步尽量避免快速冲刺，提倡有氧运动。如游泳或者水上跑步机都很有利于患骨关节炎的犬只恢复。有研究表明，在水中的康复训练的非负重慢跑要比在陆地上行动时关节的疼痛度减轻大约 40%。经常进行游泳训练可以大大缓解环节的僵硬，可以让关节的僵硬度降低 25%左右，能保证关节的灵活

度。同时，经常有意识的帮助换骨关节炎的犬进行肌肉训练也可以大大加固关节的稳定性，有利于骨关节炎的贵妇。骨关节炎的另一个原因就是肥胖因素，肥胖同样是关节炎的一大杀手。因此控制体重，适当的减肥对骨关节炎的恢复同样重要。

1.5.2 物理疗法

物理疗法治疗过程简便，在做好相关的保定后给患骨关节炎的犬只进行治疗不会让犬只有太大的应激反应，而且物理疗法经济实惠，治疗过程不难，因此成为了大多数宠主选择的一项治疗方案。但是物理治疗同样有比较大的弊端就是，物理治疗法不能彻底的治疗骨关节炎，只能起到减轻患犬的疼痛，延缓骨关节炎的发展过程，单单使用物理疗法会造成治疗效果有限，因此物理疗法通常都会搭配其他治疗方法一起进行才能达到更佳的治疗效果。物理疗法是通过改善局部血液循环来达到的镇痛消炎效果。常用的物理疗法有，热疗、水疗、针灸电疗，艾灸火疗等。物理治疗根同时兼备了治疗、康复和预防相结合的优点，在缓解骨关节炎疼痛上发挥了较大的优势。在临床治疗上兽医应该根据患犬的个体情况和宠主的经济情况来综合考虑制定一套完善合理的治疗方案。

1.5.3 药物治疗

药物治疗常用的消炎镇痛药是非甾体类药物(Nonsteroidal anti inflammatory drugs,NSAIDs)要进行消炎止痛、保护关节软骨的药物以及向关节内进行药物注射。常用的宠物保护关节软骨的药通常有葡萄糖胺盐酸盐、维生素D类、硫酸氨基葡萄糖、硫酸软骨素、二甲基砜添加物等。口服类NSAIDs药物虽然能起到很好的消炎镇痛效果但是考虑到老年犬可能会出现胃肠道疾病，长期服用非甾体类药物可能会对胃肠道刺激过大从而引起呕吐，因此需要酌情减少药量或者用其他治疗方式替代。关节腔内药物注射常用的药物有糖皮质激素类、透明质酸(HA)、富血小板血浆(PRP)、间充质干细胞(MSCs)等。

表 1-2 常见非甾体类药物

Table 1-2 Common NSAIDs,

药物名称	剂量
非甾体类抗炎药物(NSAIDs)	
乙酰水杨酸(Acetylsalicylic acid)	10～20 mg/kg POq8～12 h
卡洛芬(Carprofen)	2.2 mg/kg PO q 12 h
地拉考昔(Deracoxib)	1～2 mg/kg PO q 24 h
依托度酸(Etodolac)	10～15 mg/kg PO q 24 h
非罗考昔(Firocoxib)	5 mg/kg PO q 24 h
美洛昔康(Meloxicam)	首剂量为 0.2 mg/kg PO,然后 0. 1mg/kg POq24h
吡罗昔康(Piroxicam)	0.3 mg/kg POq48 h

1.6 间充质干细胞治疗骨关节炎的研究进展

1.6.1 间充质干细胞修复关节周边组织促进软骨发育改善 OA

已有大量研究表明 MSCs 对于犬的退行性关节病的治疗能起到明显的效果，在治疗后对犬只的关节运动范围、跛行和疼痛方面都有所改善。Cuervo 等在 39 只患有髋关节 OA 的犬用与 ASC 与 PDGF 治疗时分为两组：19 只犬使用 ASC 关节腔注射，12 只犬选择 PDGF 关节腔注射，结果表明，在经过 1 个月、3 个月和 6 个月的治疗后，两组治疗效果都减轻了犬的跛行和关节疼痛，但是用于 ASCs 治疗组的效果更好[74]。Tsai 等使用异体基因 MSCs 治疗犬膝关节 OA，他们使用猪的 ASCs 对犬的膝关节进行关节腔内注射，使用的量为每只犬 5×10^6 个 ASC，之后通过定期的跟踪查访，X 光片和犬的关节受力与布态分析中得到结果，三只犬在经过 ASCs 治疗后关节疼痛都有明显好转，无不良反应，X 光片检查下已无明显异常[75]。Shah 等在 203 只被诊断为 OA 何其他关节疾病的犬分为三组进行了同种异体 ASCAs 的治疗。128 只犬为第一组进行关节腔内的 ASCs 的注射治疗，第二组为 65 只犬静脉注射 ASCs,，第三组 10 只犬关节腔注射和静脉注射同时使用 ASCs，根据治疗效果第一组有 114 只犬的 OA 以及部分关节缺陷得到明显改善。第二组中静脉注射中有 25 只犬 OA 以及部分关节缺陷得到改善。第三组因为样本量小无法进行详细的统计分析。这项研究支持同种异体 ASC 的安全性和有效性，同时也表明关节内直接给药途径对于 MSCs 治疗来说是一个安全有效的给药途径。事实证明，MSCs 在狗身上具有极好的骨科治疗潜力，特别是对

OA，所有研究都取得了令人鼓舞的结果。即使使用同种异体，这种疗法也没有表现出明显的副作用，使其成为安全且有前途的治疗选择。MSCs 对椎间盘退变的治疗效果。椎间盘退变是引起腰背部出现疼痛的主要因素，是一种的常见疾病。椎间盘髓核细胞凋亡的失衡可能是引起椎间盘退变的原因之一，但发病机制的细节尚不清楚。到目前为止，几乎所有的椎间盘退变相关研究都以小动物为实验对象，而这些动物的髓核细胞与人类和其他大动物的并不相同。Hiyama 等[76]将犬的 BMSCs 移植入犬椎间盘退变模型，发现治疗组的椎间盘明显改善。因此，可以认为 MSCs 移植对抑制椎间盘退变是有效的。

1.6.2 间充质干细胞抑制炎症反应

MSCs 治疗基于其抗炎、免疫调节和免疫抑制潜力虽然 MSC 的作用机制尚未完全了解，它们能够与各种类型的免疫细胞相互作用，包括 T 细胞和 B 淋巴细胞、自然杀伤细胞（NK 细胞）以及巨噬细胞、中性粒细胞和单核细胞(Peroni 等人)[77]。MSC 通过三种不同的机制作用于先天免疫系统。在第一个中，随着 MSC 及其分泌组白细胞介素-6、前列腺素 E2（PGE2）、转化生长因子β（TGF-β）和肝细胞生长因子（HGF）的存在，M1 促炎巨噬细胞被转化为 M2 抗炎巨噬细胞。在第二个中，MSCs 抑制单核细胞进入树突状细胞，进一步降低其免疫反应(Maggini 等人)[78]。最后，通过生产免疫调节介质吲哚胺 2,3-二甲氧酶（IDO）、TGF-β、PGE2 和细胞间接触，MSC 还抑制 NK 细胞的增殖和细胞毒(Maggini e 等人)[79].性获得性免疫系统的相互作用通过分泌 PGE2、HGF、血氧合酶、一氧化氮（NO）、IDO、环氧合酶以及细胞到细胞接触。MSCs 抑制 T 细胞的增殖并调节其反应。它们还通过细胞间接触和细胞周期的 G0/G1 阶段的停止来抑制 B 细胞增殖(Kim 等人)[80]. 此外，MSCs 表现出显著的免疫调节能力(Arnhold 等人)[81]，使它们对临床应用特别有用，因为它们的移植不需要使用额外的免疫抑制疗法。这是由于缺乏主要组织相容性复合物 II 类（MHC-II）表达和共刺激分子，如 CD40、CD80 和 CD86，因为它们逃逸了 T 细胞和 NK 受体(Peroni 等人)[82]。最近的一项研究表明，犬 MSC 在免疫抑制途径上与人类 MSC 不同。对于犬 MSC，T 细胞抑制主要依赖于环氧合酶和 TGF-β途径，而不是发生在人类 MSC 中的 IDO 介导途径(Chow 等人)。还研究了狗中 MSC 的 BM 和 AT 源的 T 细胞抑制机制。然而，通过研究后得到，这两种来源在使用不同的生化途径来抑制 T 细胞激活

方面是等效的。脂肪源性间充质干细胞（ASC）利用 TGF-β信号通路和腺苷信号来抑制 T 细胞激活。相反，BM 衍生的间充质干细胞（BMSC）使用环氧合酶、TGF-β和腺苷信号通路(Chow 等人)[83].

1.6.3 间充质干细胞对其他疾病上的临床应用

Gibson 等人对 11 只患有半肌病的狗进行了一项研究，其中八只是警犬。所有狗都接受了 ASC 治疗，并进行了回顾性评估。其中一些是在超声指导下静脉注射的，有些是通过之前在每个患犬身上放置的静脉导管注射的。治疗一年后，每只狗的步态分析都有所改善，其中八只已经被归类为正常步态。研究中使用的每只警犬都恢复了正常的职业生活事实证明，通过临床改进和超声波控制，通过临床改善和超声控制，在治疗狗的半尾肌病中注射 MSCs 可以有效防止纤维组织的形成[84]。

Muir 等人以调查使用 MSCs 是否可以减少 12 只受十字韧带（CCL）破裂影响了犬的运动功能并且产生了关节炎症反应。入院标准包括完全单侧破裂和对侧膝盖稳定的部分破裂。在完全 CCL 破裂胫骨水平截骨术（TPLO）的手术解决过程中获得了 BM 的自体制作原料。BMSC 从这种材料中培养和扩展。随后，将干细胞静脉注射（2×10^6BMSC/千克）和关节内（5×10^6BMSC）注入对侧窒息关节。作者没有报告任何不良反应。结果显示，通过流式细胞仪、C 反应蛋白（CPR）、血清中的细胞因子浓度和 ELISA 的滑膜液评估循环 T 淋巴细胞，在减少炎症方面有显著改善。BMSC 注射后，血清和滑液中的循环 $CD8^+$ T 淋巴细胞和 CPR 较低，证明了这些细胞的抗炎潜力。他们还表示，BMSC 可能具有预防作用，降低对侧肌腱断裂的风险（Muir 等人）[85]。

Mcdougall 等人，2018 年涉及 41 只使用自体 BMSC 和 PRP 组合治疗的 ST 犬，评估超声波与治疗的演变。这项研究证明，受影响肌腱的横截面积显著减少。在治疗后的第 45 天，治疗的肢体与对侧肢体的比较显示出实质性的改善。在治疗后的第 90 天，在 90.6%的病例中，纤维模式和回声性显著改善。此外，在 13.8%的患者中，纤维模式和回声异常被认为已经解决[86]。

1.7 间充质干细胞存在的问题

MSCs 的来源：MSCs 分为自体干细胞，同种干细胞异种干细胞。在兽医中，

最常用的 MSCs 是脂肪间充质干细胞和骨髓间充质干细胞，在研究中没有被明确证实一个细胞源高于另一个细胞源，通常使用 AT 衍生的干细胞比较多，可能是因为脂肪跟容易提取，MSCs 治疗可以是自体/同种或异种，这取决于干细胞是分别从同一动物、同一物种捐赠者还是从不同物种获得。两项关于犬 OA 治疗的研究使用了猪或马的异基因 MSCs，报告了优异的结果，没有对狗造成严重不利影响。(Tsai 等人)[87-88]

MSCs 的安全性：MSCs 的免疫调节特性、抗炎潜力以及区分脂肪细胞、骨细胞和软骨细胞的能力，使它们成为能够修复受损组织的独特细胞类型。这些细胞是胚胎或诱导多能干细胞的更安全替代品，但是如果没有经过严格的筛选以及严格的临床实验，若是没有经过重新编排，它们可能会产生肿瘤的风险(Gibson 等人).[89]

MSCs 的给药途径：关于给药路线，优先选择的是直接在受伤部位注射 MSCs 的给药途径的有效性更高。对于全身性炎症时选择静脉注射 MSCs，静脉注射可以促进与免疫系统跟好的互动从而达到全身抗炎并减少多个部位疼痛的效果，另外，静脉注射 MSCs 有一定肺栓塞的风险[90]。

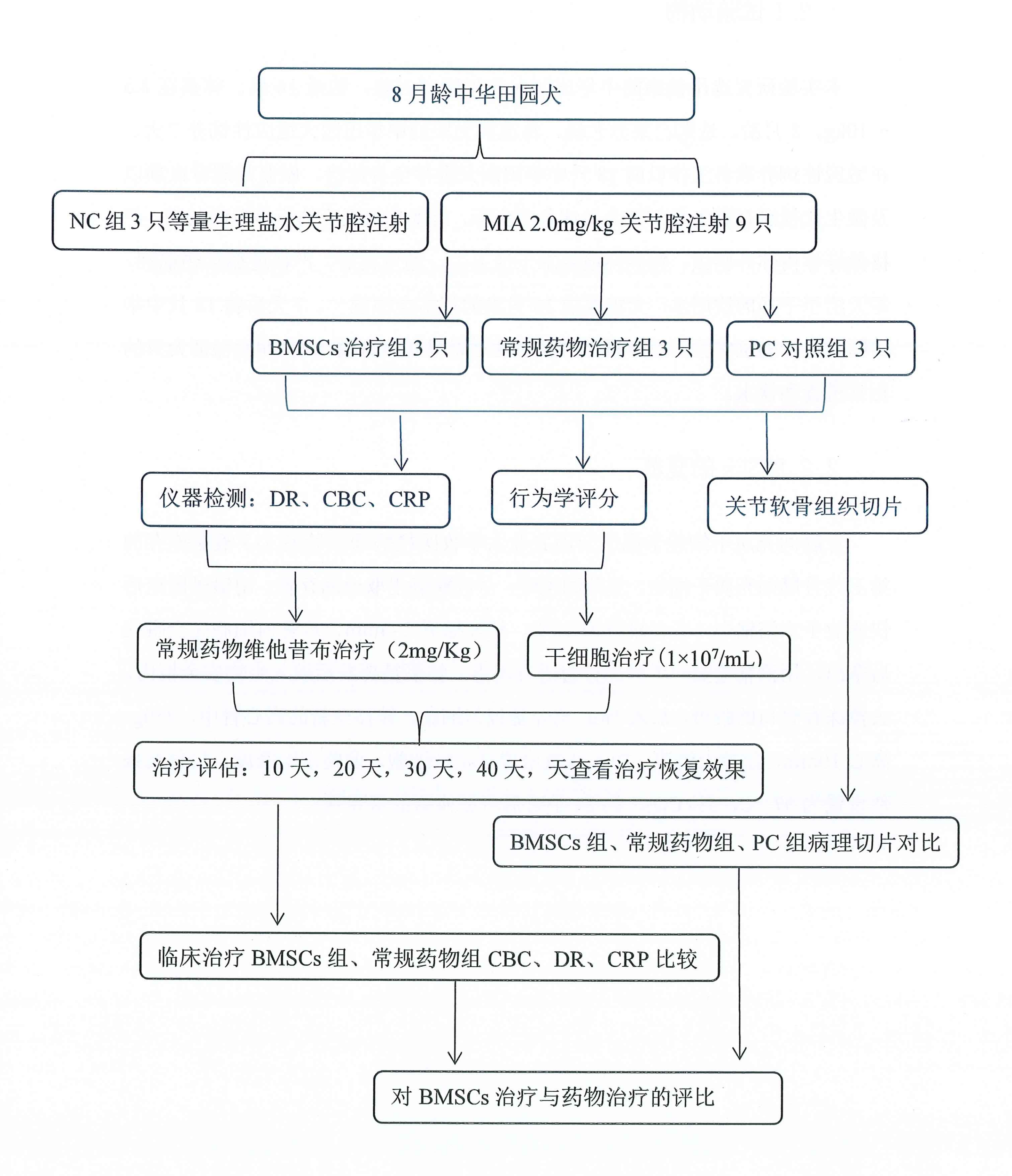
1.8 研究的目的与意义

骨关节炎是是一种常见的慢性退行性疾病，随着机体的年龄增长，关节软骨细胞自我修复能力的下降后，当关节遭受创伤骨关节炎疾病也会随之而来。年龄、体重、关节损伤、炎性因子的增多、遗传等因素都会造成骨关节炎症的发生。目前，无论是人还是犬，肥胖都是已被认为会造成骨关节炎的一个危险因素，无论是人还是家养犬，骨关节炎的患病几率都在逐年上升。然而骨关节炎的发病机制一直为能够得到很好的阐述，至今也没有能够有彻底治愈好骨关节炎的特效药，因此更加完善的阐明骨关节炎的发病机理，寻找新型更安全更高效的治疗骨关节炎的方法成为了防治骨关节炎的重中之重。

骨髓间充质干细胞治疗骨关节炎如今越来越多的被国际上承认是治疗骨关节炎的优先选取治疗方案。BMSCs 可以经分化为软骨细胞，还可以分泌多种细胞因子，促进关节软骨的修复与再生。传统的骨关节炎治疗选择口服非甾体类药物加常规消炎，由于年龄的增长、犬只自我恢复能力的不足导致常规治疗效果无

法达到预期。而使用BMSCs治疗犬骨关节炎让老年犬骨关节炎的治愈出现了新的可能，同时进行该实验也为临床使用BMSCs治疗犬骨关节炎提供理论依据和技术支持。

1.9 实验技术路线


8 月龄中华田园犬
NC 组 3 只等量生理盐水关节腔注射
MIA 2.0mg/kg 关节腔注射 9 只
BMSCs 治疗组 3 只
常规药物治疗组 3 只
PC 对照组 3 只
仪器检测：DR、CBC、CRP
行为学评分
关节软骨组织切片
常规药物维他昔布治疗（2mg/Kg）
干细胞治疗（1×10⁷/mL）
治疗评估：10 天，20 天，30 天，40 天，天查看治疗恢复效果
BMSCs 组、常规药物组、PC 组病理切片对比
临床治疗 BMSCs 组、常规药物组 CBC、DR、CRP 比较
对 BMSCs 治疗与药物治疗的评比

2. 材料与方法

2.1 试验动物

本实验研究选用健康的中华田园犬作为研究对象，数量18只。体重在8.5—10kg，8月龄，选购自某养犬场。将选购完毕的中华田园犬适应性饲养7天。在适应性饲养准备工作以前18只中华田园犬进行全身体检，做血常规看血项以及做生化检测查看中华田园犬身体各项指标，出现应激反应的应该及时处理，严格做好体内体外驱虫。饲养环境要求干净卫生，通风良好，严格遵循动物福利，每天给予干净的饮用水，犬粮要求18只犬的规格全部统一。7天后将18只中华田园犬进行随机实验分组即模型组和阴性对照组开始造模，试验期间保证犬只的正常进食和饮水。

2.2 BMSCs的复苏

骨髓间充质干细胞来源于云南农业大学牧医楼病理实验室313液氮冻存的第三代骨髓间充质干细胞。复苏细胞时，从液氮罐里取出冻存管，用镊子固定后快速放于水浴锅中，条件设置为37℃，轻轻摇晃2~4min，待管内细胞完全融化后拿出，用酒精喷壶对手和冻存管进行消毒，待酒精挥发后放入生物安全柜内。去掉冻存管口的胶带，加入1mL培养基混匀细胞，转移至新的离心管中，250g，离心10min，倒掉上清液，加入适量培养基吹吸细胞，调整细胞密度，培养箱条件设置为37 ℃，5% CO_2，约24小时后可更换新的培养基。

2.3 仪器设备

仪器设备	生产商
Beckman 低温超速离心机	美国 Beckman 公司
Thermo 生物安全柜	美国 Thermo scientific 公司
CO_2 培养箱	美国 Thermo scientific 公司
DHP-600 型电热恒温培养箱	北京市永光明医疗仪器有限公司
华普达 SHZ-82 气浴恒温振荡器	常州市华普达教学仪器有限公司
普华达 SK-1 快速混匀器	常州市华普达教学仪器有限公司
XDS-2 倒置显微镜	重庆光电仪器总公司
Countess II 自动细胞计数仪	美国 Thermo scientific 公司
BIO-RAD PCR 仪	美国 BIO-RAD 公司
Eppendorf PCR 仪	德国 Eppendorf 公司
BC/BD-230S-70°C 低温冰箱	青岛海尔特种电冰柜有限公司
YXQ-SG46-280 不锈钢压力蒸汽灭菌器	上海博迅实业有限公司医疗设备厂
DANGERSJ-CJ-1F 型超净工作台	苏州苏洁净化设备有限公司
IHIY-99 型微型高速离心机	广州正仪生物技术有限公司
LD4-2A 型低速离心机	北京医用离心机厂
HWS-20 型恒温水浴箱	江苏太仓市实验设备厂
微量移液器	美国 Thermo scientific 公司
干式免疫荧光定量分析	徐州百惠生物科技有限公司
兽用全自动血液细胞分析仪	深圳迈瑞生物股份有限公司
医用诊断 X 射线管组件	东芝电子管器件株式会社

2.4 主要试剂

试剂名称	来源
DEPC	北京百泰克生物有限公司
胎牛血清（FBS）	Gibico 公司
IMDM 培养基	Hyclone 公司
DMEM/F12 培养基	Gibico 公司
RPMI 1640 培养基	Gibico 公司
胰蛋白酶溶液（0.25 % trypsin-EDTA）	Gibico 公司
青链霉素溶液（双抗）	Gibico 公司
PBS 磷酸缓冲液	上海源叶生物有限公司
DMSO	美国 sigmal 公司
无水乙醇（分析纯）	四川西陇化工有限公司
DNA Marker	北京百泰克生物有限公司
2 xEasy Taq PCR Super Mix	北京百泰克生物有限公司
牛血清白蛋白（BSA）	中国 biosharp 生物科技有限公司
碘乙酸钠（MIA）	上海源叶生物科技

2.4.1 主要溶液配制

碘乙酸钠溶液：称取足够量的粉末状碘乙酸钠，用生理盐水将其溶解。抽取1ml 生理盐水配制碘乙酸钠溶液，按照 2.0mg/kg 的碘乙酸钠剂量比配制，配制完毕后可对犬关节腔注射。

4%多聚甲醛：多聚甲醛称重 0.4g，加入 pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液 10ml，在水浴锅加热至 60° C 并不断搅拌至溶解，直至液体澄清，调节 pH 为 7.4。

2.5 犬 OA 的模型建立

2.5.1 药物剂量换算

人和动物的体表面积算法、不同物种之间药物剂量换算法：引自章元沛（人名卫生出版社）第二版《药理实验学》人和动物的体表面积计算法、不同物种之

间药物剂量换算法。

人或动物之间药物剂量的换算：

为使用方便，可按“mg/kg 折算 mg/m² 的转换因子”进行换算（表）：

查表 2-1 得：大鼠转换因子为 6,狗的转换因子为 19，按下式计算：由小动物剂量(如大鼠)换算大动物(如狗)剂量：

狗的试用剂量 (mg/kg)=大鼠剂量(mg/kg)×(大鼠的转换因子/狗的转换因子)

由大动物剂量(如狗)换算小动物(如大鼠)剂量：

大鼠的试用剂量 (mg/kg)=狗剂量(mg/kg)×(狗的转换因子/大鼠的转换因子)

在不知道实验犬的用药剂量时，需要通过由大鼠的用药剂量乘狗的转换因子来计算得出（表 2-1）。

表 2-1.不同种类动物间剂量换算时的常用数据

Table 2-1 Commonly used data for dose conversion between different animal species

动　　物	Meeh-Rubner 公式的K值	mg/kg→mg/m² 转换因子	与小鼠转换因子 的比值
小鼠	9.1	3	1(20g)
大鼠	9.1	6	2(200g)
仓鼠	9.0	4.1	1.37
豚鼠	9.8	8	2.67(400g)
家兔	10.1	12	4(2 kg)
猫	9.9	14	4.67(2.5 kg)
狗	11.2	19	8(10 kg)
猴	11.8	12	4(3 kg)
人	10.6	36	12(50 kg)

2.5.2 造模前准备

提前准备好推毛剪、1ml 注射器、75%酒精、碘伏、配制好的 MIA 溶液。在造模前需要把所有需要造模的模型犬膝关节进行脱毛和消毒。

2.5.3 MIA 剂量预实验

选用 6 只中华田园犬随机分配为 3 组，每组两 2 只，分别为低剂量组，中剂量组，高剂量组进行 MIA 药物剂量预实验关节腔注射。根据人和动物的体表面积算法、不同物种之间药物剂量换算法：引自章元沛（人名卫生出版社）第二版《药理实验学》：人和动物的体表面积计算法、不同物种之间药物剂量换算法”。

算得预实验所需MIA药物剂量组：低剂量组1.5mg/kg、中剂量组2.0mg/kg、高剂量组3.0mg/kg。每4d关节腔注射一次MIA。三组剂量组结果为低剂量组两周后未出现跛行；中剂量组两周后成功出现跛行，关节肿胀；高剂量组在MIA注射进关节腔第二天就出现关节严重肿胀，跛行明显。

2.5.4 MIA正式实验

最终选定MIA药物剂量为2.0mg/kg，每4d关节腔注射一次MIA总共关节腔注射4次MIA。将12只中华田园犬进行随机分组(n=3），分为3只NC对照组、9只MIA模型组。除NC对照组不进行MIA溶液关节注射外，其余犬只都进行MIA溶液关节腔注射。在注射前选择所有需要造模的犬进行右后腿膝关节脱毛，然后先用碘伏进行一次消毒，再用75%酒精脱碘与二次消毒。采用关节腔注射的方法需要借助B超，将注射器针头延右后腿外侧髌骨下缘斜向上45°刺破皮肤进针，在B超观察下可以看见注射器针头进入低回声区域，即含有关节液的关节腔时将配置好的1mlMIA溶液（2.0mg/kg）推入关节腔内，注射器针头刺入关节腔后有明显的落空感。

2.6 动物分组与干预

2.6.1 实验分组

12只中华田园犬实验犬随机分组，分为NC对照组3只，模型组9只，当模型组建模成功后又将模型组随机分成三组(n=3)；分别为3只BMSCs治疗组、3只常规药物治疗组、3只PC对照组。保证每日正常进食进水，饲养环境通风，干净整洁。

2.6.2 实验干预

NC对照组：作为正常犬只对照比较

模型组：首先，造模成功后需要最大程度上模拟日常生活中患OA犬只的宠物犬正常作息与生活环境，夜间休息的犬舍需要有软垫提供给模型犬休息，尽量的避免造模成功患上OA的犬因为犬舍地板过硬导长时间保持一个睡姿压住关节导致OA的进一步加重，同时注意犬舍的保暖，最大程度保证模型组的犬只其他各项身体指标的正常。其次，保证每天模型组犬只两次的外出活动，每次活动

不低于 15min.注意模型组犬只的步态变化、跑步姿态、上楼姿态、坐卧姿态以及行走时长。保证每天基础的活动量能最大程度的避免膝关节因为长时间得不到活动而产生的关节僵硬。患有 OA 的犬只通常都会出现晨僵的问题，只有保证每日正常活动，保证关节的基本灵活性，不出现病情发展的过快而加大后期的治疗难度才不会延长试验的周期。

2.7 膝关节内注射骨髓间充质干细胞治疗 OA

对 BMSCs 治疗组进行膝关节内注射 BMSCs 治疗 OA。在注射前需要将 BMSCs 治疗组的犬进行右后腿膝关节脱毛，用碘伏进行一次消毒，再用 75%酒精脱碘与二次消毒。采用关节腔注射的方法需要借助 B 超，将注射器针头延右后腿外侧髌骨下缘斜向上 45° 刺破皮肤进针，在 B 超观察下可以看见注射器针头进入低回声区域，即含有关节液的关节腔时将配置好的 BMSCs 推入关节腔内，注射器针头刺入关节腔后有明显的落空感。每只犬注射的骨髓间充质干细胞的数目为 1×10^{7} 个骨髓间充质干细胞混悬液。BMSCs 每周进行两次膝关节注射，常规治疗药维他昔布按 2mg/kg，每周口服 2 次，治疗周期为 40d.。BMSCs 治疗组和常规治疗组在开始治疗时 1-5d 天内需要正常使用抗菌药物，抗菌药物选择常规消炎药氨苄西林钠 10mg/kg 皮下注射。

2.8 临床检测

2.8.1 一般情况观察

每天观察犬只的精神状态、进食量饮水量、记录体重、体温、对外界刺激做出的反应、每日机体运动的变化、毛色、粪便形态是否正常、尿液颜色等一般情况，需要密切关注每只犬的生命体征。

2.8.2 体温测量

从碘乙酸钠造模骨关节炎成功第一天开始治疗时，每天分别记录 BMSCCs 治疗组、常规药物治疗组和 PC 对照组的体温，记录周期为 4 周。

2.8.3 采血

在 BMSCs 模型组、常规药物治疗组和 PC 对照组第 10d、20d、30d、40d 时

抽取模型犬前肢臂头静脉0.5ml根据全国临床检验操作规程（第四版）血常规检测。

2.8.4 关节炎 Lequesne 评分

用 Lequesne MG 膝关节评估法，评估碘乙酸钠成功造模骨关节炎，通过具体数自化的数据可以更加直观的感受造模成功后的骨关节炎变化。根据局部的按压刺激，站立、行走、奔跑时呈现出的疼痛的步态表现，关节活动的范围情况以及关节的肿胀程度四个方面来进行评价，需要每周进行一次膝关节疼痛评估。具体评价方法如下：

（1）局部疼痛刺激反应：用手挤压、棉签按压犬右后膝关节，观察模型犬对刺激的不同反应程度划分为 4 个等级：

Ⅰ允许人员接近，无躲闪行为，无异常疼痛反应；

Ⅱ.对人员的接近出现回避行为，触摸挤压模型犬右后膝关节有收缩患的动作；

Ⅲ对人员的接近表现出慌乱触摸挤压患肢收缩、痉挛，同时伴轻度全身反应，如全身颤抖、回头舔吮患肢等；

Ⅳ对人员接近表现出惊恐，发抖乱窜，极度不愿人员的接近，轻轻触摸患肢就表现出收缩剧烈、痉挛、尖叫，同时伴有全身颤抖、乱窜、挣扎。

（2）按模型犬站立、行走、奔跑时呈现出的疼痛的步态表现分为 4 级：

Ⅰ模型犬造模右后肢无明显跛行，跑动正常，跳跃正常，蹬地有力；

Ⅱ模型犬在奔跑时右后肢右抬腿动作，轻度跛行，但蹬地有力；

Ⅲ模型犬右后肢行走与跛行明显；

Ⅳ模型犬右后肢能收缩收缩，但不能参与行走，甚至不能蹬地、触地。

(3)按模型犬右后肢膝关节活动范围不同分为 4 级(伸直为 0°)：Ⅰ 90°以上；Ⅱ 45°～90°；Ⅲ 15°～45°；Ⅳ 0°～15°

（4）按模型犬右后膝关节肿胀程度不同分为 3 级：

Ⅰ模型犬右后膝关节无肿胀，可清楚看见膝骨关节轮廓；

Ⅱ模型犬右后膝关节轻度肿胀，膝骨关节轮廓变浅；

Ⅲ模型犬右后膝关节明显肿胀，膝骨关节轮廓消失。

表 2-2.关节炎 Lequesne 评分

Table 2-2 Lequesne score for arthritis

	疼痛等级	分值
局部反应	Ⅰ - Ⅳ	10-40
步态改变	Ⅰ - Ⅳ	10-40
关节活动	Ⅰ - Ⅳ	10-40
关节肿胀	Ⅰ - Ⅲ	10-30

注：阴性对照组无疼痛，分值为“0”

Note：no pain in the negative control group, score of "0"

2.8.5 cCRP 检测

利用免疫层析技术定量检测血清、血浆或全血样本中 cCRP 的含量。将测试样本加入稀释液中泥匀，将混合液滴加到测试卡的加样孔内，样本中的 cCRP 与荧光标记的 cCRP 抗体结合形成免疟复合物。免疫复合物流经测试区与测试区 cCRP 抗体反应，经特定波长激发后在反应区产生荧光信号，信号的强弱与样本中 cCRP 的含量成正比。利用荧光检测仪可定量检测出样本中 cCRP 的浓度。

表 2-3.cCRP 指标判读

Table 2-3 Interpretation of cCRP indicators

数值	意义
＜10	正常（—）
10-40	轻微炎症（+）
40-100	中度炎症（++）
＞100	重度炎症（+++）

（1）实验检测前提前 10 分钟将试剂盒从冰箱中拿出，放置室外恢复到正常室温。若检测卡处于低温状态应先将检测卡在室温静置 20min（室温 20~25 度为宜），若常温则无需此步骤操作。

（2）把试剂盒中的 IC 卡放在检测仪的读卡区进行 CRP 数据读取，免疫荧光定量回自动读取 IC 卡的信息。

（3）从模型犬前肢腕关节正前方偏内侧的皮下臂头静脉采血 1ml，放入肝素钠抗凝管中用 1200rpm 离心机离心 1min 后拿出离心机放在室温下。

（4）用移液枪吸取 5μl 的血浆样本放入样本稀释液中，用移液枪反复捶打，充分混匀。

（5）从铝箔袋中取出检测卡（拆封后应尽快使用），将检测卡放置在干净的水平台面上，水平放置并做好标记。

（6）以下两种检测模式根据实际情况选择其中一种：

A 快速检测：在加样孔处低加 100μl 稀释后的样本，开始计时，5min 后将检测卡插入仪器，点击仪器屏幕上的“快速测试”，点击开始检测，仪器开始检测并打印检测报告。

B 标准测试：在加样孔处低加 100μ稀释后的样本，并将检测卡插入读卡仪读卡空中，点击仪器屏幕上的“标准测试”，点击开始检测，仪器自动开始计时时，孵育 5min 后仪器自动检测，并打印检测结果。

（7）结果判定：试剂盒的检测范围是 2~250mg/L. 试剂盒结果判读，浓度范围 mg/L，正常范围(-)＜10、轻微感染（+）10~40、中度感染（++）40~100、重度感染（+++）＞100.

（8）注意事项：检测卡应在保质期内，开封后在 30min 内使用；不要重复使用试纸；不要混用不同批次产品的 IC 卡，稀释液；使用后的检测卡应视同微生物危险品处理。

（9）检测结束后根据检测结果分析数据并用数据作图。

2.8.6 DR 影像学观察实验犬患肢情况

在 BMSCs 治疗组、常规药物治疗组和阳性对照组第 10d、20d、30d、40d 时分别拍摄观察髌骨腹侧骨质和滑车脊骨质的缺损以及关节周边骨质增生情况。

2.8.7 病理学观察及样本取材

实验终点时，将 PC 组、NC 组、BMSCs 治疗组、常规治疗组选取需要的犬只，先静脉推注丙泊酚诱导麻醉，之后采用异氟烷呼吸麻醉，右后肢膝关节处剃毛，先用碘伏对裸露的皮肤进行消毒，再用 75%的酒精脱碘二次消毒膝关节附近的皮肤，切开皮肤暴露膝关节观察不同组膝关节的情况，拍照记录。随后将模型犬进行右膝关节取样用来制备病理组织切片。小心剔除关节周围的韧带和肌肉组织，剪断关节上下方的股骨和胫骨，在不破坏关节腔的前提下取下完整的关节；将模型犬膝关节放入 4%多聚甲醛固定液中固定 72 小时，然后放入浓度为 10% EDTA 脱钙液中浸泡 3 周进行脱钙处理，每周更换一次新鲜的 10% EDTA 脱钙液。

2.8.8 石蜡切片制作

（1）将模型犬的膝关节组织从4%的多聚甲醛固定液中取出，放置于通风橱内进行样品的修剪，用手术刀片将膝关节样品上多余的剔除并将样本修理平整。然后将处理好的样本组织放进脱水盒中并在脱水盒上贴标签注明。

（2）将贴好标签的脱水盒组织用流动水冲洗20min，后将冲洗好的脱水盒放在脱水机中进行酒精梯度脱水。①具体脱水步骤如下：75%浓度酒精脱水3h；85%浓度酒精脱水过夜；95%浓度酒精脱水2h；100%浓度酒精脱水分两次，先用100%酒精Ⅰ脱水1h、再用100%酒精Ⅱ脱水1h。②二甲苯脱水透明：根据切片厚度、组织性质二甲苯透明时间在15s~30s之后进行蜡浸脱水，蜡Ⅰ浸泡1h，蜡Ⅱ浸泡1h。

（3）石蜡包埋：将脱水完成的组织从脱水盒中小心取出放入石蜡包埋框贴好标签，提前把所需要的石蜡数量放进石蜡包埋机中融化，然后将液体石蜡倒入做好标签的石蜡包埋框中，将石蜡包埋框放置于-20℃的冷冻台上冷冻，待石蜡完全冷却凝固后取出石蜡进行蜡块形状修理。

（4）切片：将修剪好的石蜡块放在切片机上，调整好刀片和石蜡块的距离开始制备石蜡切片，切片厚度5μm。展片：切好的薄片用毛笔轻轻放入摊片机水中轻轻展开，摊片机水温38℃。切片展开后用载玻片捞出。烤片：将载玻片放入烤箱中60℃烤制2h，待石蜡烤化后取出常温保存备用。

（5）将模型犬的膝关节组织从4%的多聚甲醛固定液中取出，放置于通风橱内进行样品的修剪，用手术刀片将膝关节样品上多余的剔除并将样本修理平整。然后将处理好的样本组织放进脱水盒中并在脱水盒上贴标签注明。

（6）将贴好标签的脱水盒组织用流动水冲洗20min，后将冲洗好的脱水盒放在脱水机中进行酒精梯度脱水。①具体脱水步骤如下：75%浓度酒精脱水3h；85%浓度酒精脱水过夜；95%浓度酒精脱水2h；100%浓度酒精脱水分两次，先用100%酒精Ⅰ脱水1h、再用100%酒精Ⅱ脱水1h。②二甲苯脱水透明：根据切片厚度、组织性质二甲苯透明时间在15s~30s之后进行蜡浸脱水，蜡Ⅰ浸泡1h，蜡Ⅱ浸泡1h。

（7）石蜡包埋：将脱水完成的组织从脱水盒中小心取出放入石蜡包埋框贴好标签，提前把所需要的石蜡数量放进石蜡包埋机中融化，然后将液体石蜡倒入

做好标签的石蜡包埋框中，将石蜡包埋框放置于-20℃的冷冻台上冷冻，待石蜡完全冷却凝固后取出石蜡进行蜡块形状修理。

（8）切片：将修剪好的石蜡块放在切片机上，调整好刀片和石蜡块的距离开始制备石蜡切片，切片厚度 5μm。展片：切好的薄片用毛笔轻轻放入摊片机水中轻轻展开，摊片机水温 38℃。切片展开后用载玻片捞出。烤片：将载玻片放入烤箱中 60℃烤制 2h，待石蜡烤化后取出常温保存备用。

2.8.9 HE 染色

将采样得到的模型组犬膝关放入 4%多聚甲醛固定液中先进性组织固定，后从4%多聚甲醛溶液中取出放入浓度为10% EDTA 脱钙液中浸泡3周进行脱钙处理，每周更换一次新鲜的 10% EDTA 脱钙液。脱钙完成后将犬膝关节组织进行修剪，修剪完成制作石蜡切片。对制备完毕的关节软骨组织和关节滑膜组织进行石蜡切片，石蜡切片制作完毕后进行脱蜡处理、水化处理。

（1）石蜡切片脱蜡需要用二甲苯或者浸蜡脱蜡透明液浸泡作用两次，每次浸泡作用时间为 5~10min；

（2）为保证脱蜡效果可选用无水乙醇浸泡作用 2 次，每次时长 3~5min；

（3）用 95%浓度的乙醇浸泡作用 1 次，时长 3~5min；

（4）用 90%浓度乙醇浸泡作用 1 次，时长 3~5min；

（5）用 80%浓度乙醇浸泡作用 1 次，时长 3~5min；

（6）蒸馏水或者自来水冲洗残留乙醇，亦或者可用 30~40°C的温水进行残留乙醇的冲洗，冲洗时长为 1~3min；

（7）染色：脱蜡完毕后需要将切片在室温晾晒多余的水分，之后放入苏木素染色液中染色，染色时长 3~8min；

（8）蒸馏水或者自来水冲洗 5~10S；放入盐酸乙醇继续分化 2~5S，蒸馏水或自来水冲洗 20~30S；

（9）进行反蓝处理，使用蓝化液或者温水反蓝，作用时长 20~40S；选用浓度为 80%的乙醇脱水处理，时长 30~60S；

（10）用伊红染色液进行染色，染色时长 30S~3min，视情况而定，若染色时间过长后续脱色难度会加大；

（11）之后进入脱水、透明、封固，用 80%浓度的乙醇浸泡作用 10~20S；

放入 90%浓度的乙醇浸泡，时长 10~20S；放入 95%浓度的乙醇作用 2 次，每次时长 1~2min；放入无水乙醇作用 2 次，每次时长 2~3min；

（12）放入二甲苯或者浸蜡脱蜡透明液透明 3 次，每次时长 2~3min；

（13）上述操作完成后进行封片，用中性树脂封片完毕等待树脂干燥硬化即可进行切片观看然后对骨关节炎切片进行量化评分。

2.9 统计学分析

采用 SPSS26.0 软件进行统计分析，数据以均数土标准差（$x \pm S$）表示，组间比较采用单因素方差分析检验。

3. 结果

3.1 一般情况观察

MIA 造模后在 6 天后也就是第二次关节腔注射 MIA 后开始出现轻微跛行，但对行走和奔跑不会造成太大影响，在第三次 MIA 关节腔内注射隔天后膝关节可见明显肿大发红，骨性标志消失，右后腿无法落地或只能做到轻微点地。模型犬性格变得易惊，胆小，拒绝人员碰触跛行右后腿。大约在一周半到两周后膝关节会缓慢消肿，在两周后跛行不会消失，跛行也不会随着时间减轻，会随着时间的加长跛行越来越严重。饮食状况在造模成功出现炎症的第一只周食欲会轻微减退，随之食欲恢复正常（图 3-1），每只实验犬毛色正常，无脱毛情况，尿液正常，粪便形态正常。

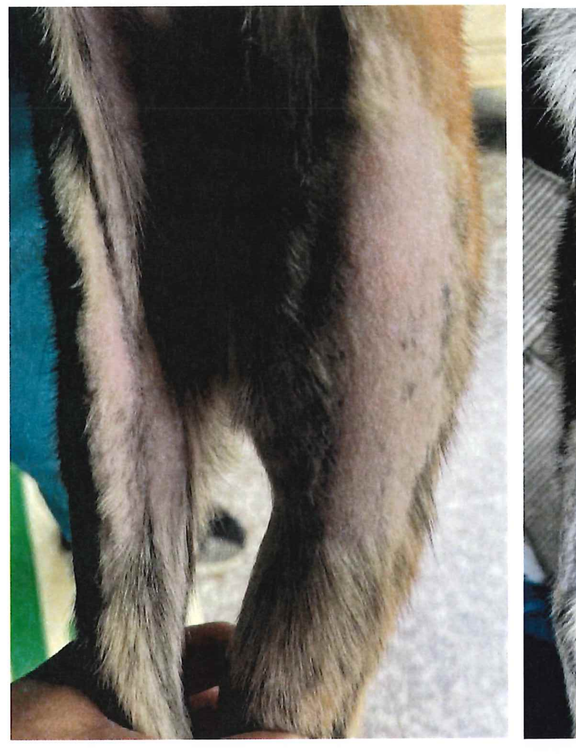
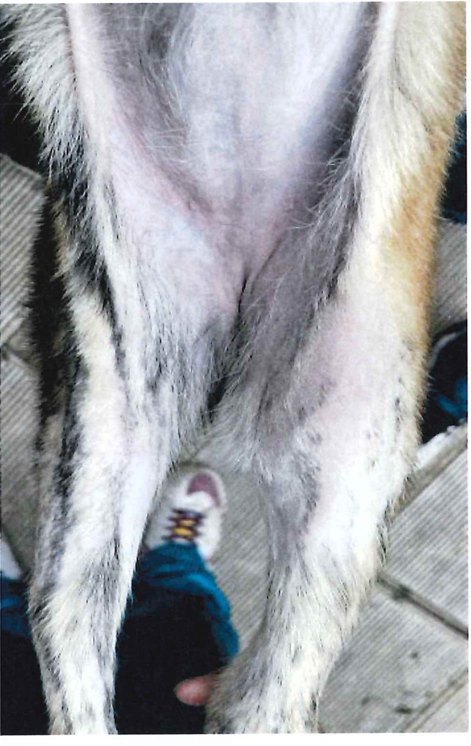



图 3-1：两周后犬膝关节消肿但跛行不会消失

Fig 3-1: After two weeks, knee swelling is reduced but lameness does not disappear

3.2 体温变化情况

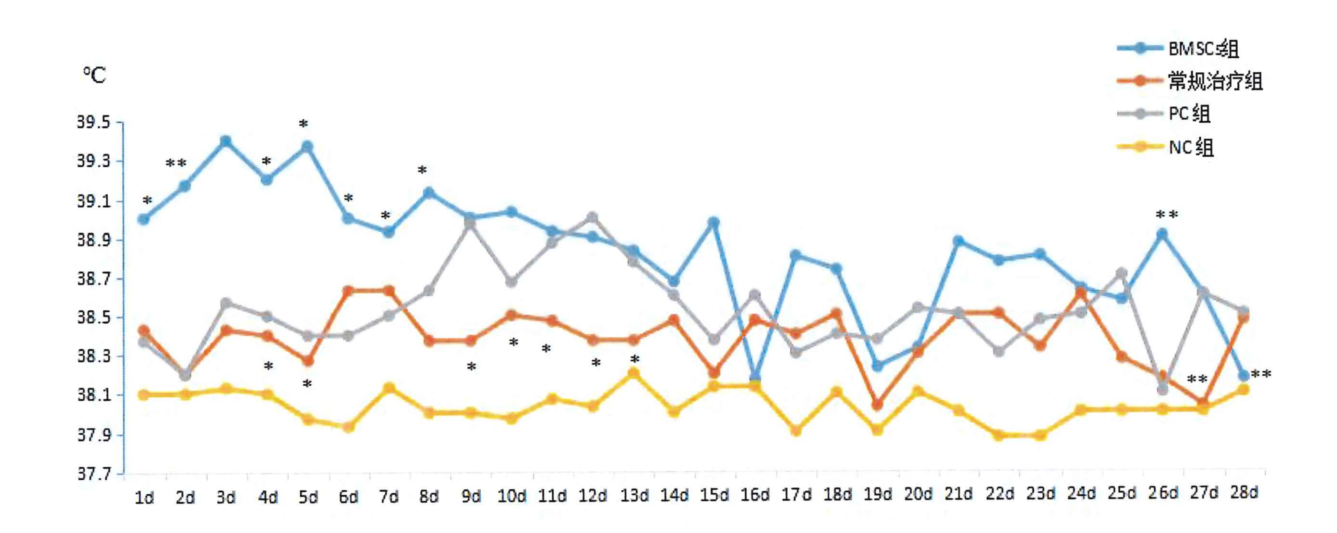
表 3-1 犬 28d 体温监控

Table 3-1 28d temperature monitoring of dogs

组别	周	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d
BMSCs 组	1w	39.00±0.20*	39.17±0.21**	39.40±0.30	39.20±0.44*	39.37±0.15*	39.00±0.36*	38.93±0.15*
常规治疗组		38.43±0.15	38.20±0.10	38.43±0.06	38.40±0.20*	38.27±0.55*	38.63±0.06	38.63±0.25
PC 组		38.37±0.35	38.20±0.10	38.57±0.15	38.50±0.35	38.40±0.26	38.40±0.20	38.50±0.20
NC 组		38.13±0.15	38.13±0.15	37.90±0.10	38.10±0.26	38.27±0.21	38.27±0.15	38.13±0.12
BMSCs 组	2w	39.13±0.25*	39.00±0.10	39.03±0.06	38.93±0.21	38.90±0.00	38.83±0.12	38.67±0.12
常规治疗组		38.37±0.21	38.37±0.15*	38.10±0.26*	38.47±0.12*	38.37±0.15*	38.37±0.15	38.47±0.06
PC 组		38.63±0.25	38.97±0.15	38.67±0.15	38.87±0.15	39.00±0.17	38.77±0.12	38.60±0.00
NC 组		38.10±0.10	38.10±0.10	38.13±0.15	38.10±0.10	37.97±0.21	37.93±0.06	38.00±0.26
BMSCs 组	3w	38.97±0.06	38.17±0.06	38.80±0.10	38.73±0.15	38.23±0.06	38.33±0.06	38.87±0.06
常规治疗组		38.20±0.10	38.47±0.06	38.40±0.10	38.50±0.10	38.03±0.06	38.30±0.10	38.50±0.10
PC 组		38.37±0.32	38.60±0.10	38.30±0.10	38.40±0.10	38.37±0.06	38.53±0.06	38.50±0.10
NC 组		38.00±0.26	38.00±0.26	37.97±0.21	38.07±0.21	38.03±0.15	38.20±0.10	38.00±0.30
BMSCs 组	4w	38.77±0.06	38.80±0.10	38.63±0.15	38.57±0.23	38.90±0.10**	38.60±0.10	38.17±0.15**
常规治疗组		38.50±0.10	38.33±0.06	38.60±0.10	38.27±0.25	38.17±0.15	38.03±0.06**	38.47±0.06
PC 组		38.30±0.10	38.47±0.06	38.50±0.10	38.70±0.26	38.10±0.10	38.60±0.10	38.50±0.10
NC 组		37.87±0.06	37.87±0.06	38.17±0.06	38.23±0.38	38.30±0.10	38.03±0.15	38.10±0.10

注：表中*表示组间差异显著，表中**表示组间差异极显著。

Note: * in the table indicates significant difference between groups, and * * in the table indicates extremely significant difference between groups.



天数

图 3-2 试验犬体温变化波动

Figure 3-2 Temperature fluctuation of test dogs

BMSCs 治疗组在 1d-10d 时犬体温升高，并在 12d 内犬体温保持在 39℃以上，平均体温高于常规治疗组的体温，14d 后体温开始恢复正常，在 17d 时体温小幅升高，持续一天后恢复正常，21d 时体温小幅升高，持续 2d 后体温恢复正常。

PC 组与 BMSCs 治疗组比较：1d 时 BMSCs 治疗组显著高于 PC 组体温($P<0.05$)，2d 时 BMSCs 治疗组极显著高于 PC 组体温($P<0.01$)，4d、5d 时 BMSCs 治疗组显著高于 PC 组体温($P<0.05$)，6d、7d、8d 时 BMSCs 治疗组显著高于 PC 组体温($P<0.05$)，26d 时 BMSCs 治疗组体温显著高于 PC 组体温($P<0.01$)，28d 时 BMSCs 治疗组体温极显著低于 PC 组体温($P<0.01$)；

常规治疗组与 BMSCs 治疗组比较和常规治疗组比较：4d、5d 时常规治疗组体温显著低于 BMSCs 体温($P<0.05$)，9d、10d、11d 常规治疗治疗组体温显著低于 BMSCs 治疗组体温($P<0.05$)；

PC 组与常规治疗组相比较：12d 时 PC 组显著高于常规治疗组体温($P<0.05$)，27d 时 PC 组极显著高于常规治疗组($P<0.01$)。（见图 3-2 和表 3-1 ）。

3.3 血常规检测结果

表 3-2 血常规检测指标（x±S，n=3）

Table 3-2 Indexes of routine blood test. （x±S，n=3）

监测指标	组别	治疗 10d	治疗 20d	治疗 30d	治疗 40d
WBC(10^9/L) 参考范围：6.00-17.00	BMSCs 组	25.56±0.88**	26.55±0.99	10.38±0.57**	8.20±0.91**
	常规治疗组	24.50±1.88**	26.37±1.51	10.94±1.00**	10.32±1.91**
	PC 组	36.30±1.89	37.43±2.15	22.83±2.27	20.44±1.91
	NC 组	9.33±1.28	9.54±0.82	9.54±0.82	10.41±1.05
RBC(10^12/L) 参考范围：5.10-8.50	BMSCs 组	7.18±1.32**	7.74±1.40	6.89±0.83*	7.04±1.24**
	常规治疗组	7.24±1.23**	7.11±1.66*	7.55±1.02**	6.12±0.75*
	PC 组	4.32±0.80	4.66±1.44	5.04±0.66	5.42±0.65
	NC 组	7.91±1.30	6.67±1.30	5.89±0.99	7.11±0.92
Lym# (10^9/L) 参考范围：0.80-5.30	BMSCs 组	2.47±1.20	2.73±1.53	2.59±0.82	2.82±1.26
	常规治疗组	3.04±1.30	2.35±1.61	2.43±0.56	2.28±0.79
	PC 组	1.55±0.52	1.53±1.21	0.97±0.44	2.00±1.15
	NC 组	2.89±0.50	4.12±0.98	2.53±0.91	4.23±0.89
Neu# (10^9/L) 参考范围：3.20-12.30	BMSCs 组	7.74±2.32	7.48±1.79	5.78±0.99**	8.81±1.54
	常规治疗组	8.71±2.67	7.13±1.77	7.08±1.92	9.38±1.13
	PC 组	11.29±3.15	12.61±3.83	7.63±1.85	9.35±1.59
	NC 组	7.47±1.46	7.12±1.31	5.26±0.62	7.34±0.65
PLT 参考范围：117-490	BMSCs 组	318.11±10.60**	233.00±3.71	215.56±2.74	231.33±3.91
	常规治疗组	320.44±15.42**	352.89±3.76	223.67±1.58	238.89±3.44
	PC 组	431.89±14.69	456.67±4.56	254.56±2.13	354.89±4.48
	NC 组	315.78±32.24	247.67±22.80	307.00±42.97	302.56±32.30

注：表中*表示差异显著，表中**表示差异极显著。PC 组：阳性对照组、NC 组：阴性对照组。

Note: * in the table means significant difference, ** in the table means extremely significant difference.PC group: positive control group, NC group: negative control group.

根据血常规结果（表 3-2），BMSCs 治疗组、常规药物治疗组在治疗 10d 和 20d 后与阳性组相比较白细胞有明显降低，30d 时 WBC 恢复正常值，RBC 在治疗 10d 天后与 PC 组相比较，BMSCs 组、常规药物组 RBC 值已经升到正常范围。中性粒细胞数目在 10d 后已经恢复到正常值范围，并趋于稳定。

WBC：在 10d 时 PC 组极显著高于 BMSCs 治疗组（$P<0.01$）、PC 组极显著高于常规治疗组($P<0.01$)；在 30d 时，PC 组极显著高于 BMSCs 治疗组($P<0.01$)、PC 组极显著高于常规治疗组（$P<0.01$）；在 40d 时 PC 组极显著高于 BMSCs 治疗组（$P<0.01$）、PC 组极显著高于常规治疗组（$P<0.01$）；

RBC：在 10d 时 PC 组极显著低于 BMSCs 治疗组比较为（$P<0.01$）、PC 组极显著低于常规治疗组($P<0.01$)；在 20d 时 PC 组显著低于常规治疗组($P<0.05$)；在 30d 时 PC 组显著低于 BMSCs 治疗组（$P<0.05$）、PC 组极显著低于常规治疗组（$P<0.01$）；在 40d 时 PC 组极显著低于 BMSCs 治疗组（$P<0.01$）、PC 组显著低于常规治疗组（$P<0.05$）；

Lym#：在 10d 到 40d 时没有出现明显变化无显著性差异；

Neu#：在 30d 时 PC 组极显著低于 BMSCs 治疗组（$P<0.01$）；

PLT：在 10d 时 PC 组极显著低于 BMSCs 治疗组（$P<0.01$）、PC 组极显著低于常规治疗组（$P<0.01$）。

根据血常规显示，BMSCs 组 WBC 数目经过治疗后低于常规治疗组 WBC 数目；RBC 数目经过治疗后 BMSCs 组高于常规治疗组；Lym#数目经过治疗后 BMSCs 组高于常规治疗组：Neu#数目经过治疗后 BMSCs 组低于常规治疗组。

3.4 治疗组与阳性对照组骨关节炎 Lequesne 评分

表 3-3 BMSCs、常规药物治疗对实验犬 OA Lequesne 评分（x±S，n=3）

Note: Table 3-3 OA Lequesne score of BMSCs and conventional drug therapy (x±S, n=3),

组别	例数	治疗前	治疗 10d	治疗 20d	治疗 30d	治疗 40d
BMSCs 组	3	25.83±4.17	21.75±4.52*	18.75±3.77*	14.58±3.03**	7.42±2.07**
常规治疗组	3	26.25±4.33	23.25±3.86*	23.42±4.08*	16.75±2.99**	10.58±2.50**
PC 组	3	27.08±4.50	26.42±4.38	26.67±2.46	28.75±3.77	26.67±4.44
P			0.011	0.017	0.000	0.000

注：表中*表示组间差异显著，表中**示组间差异极显著。阴性对照组无疼痛，分值为“0”

Note: * in the table indicates significant differences between groups, and ** in the table indicates extremely significant differences between groups.The negative control group had no pain and the score was "0".

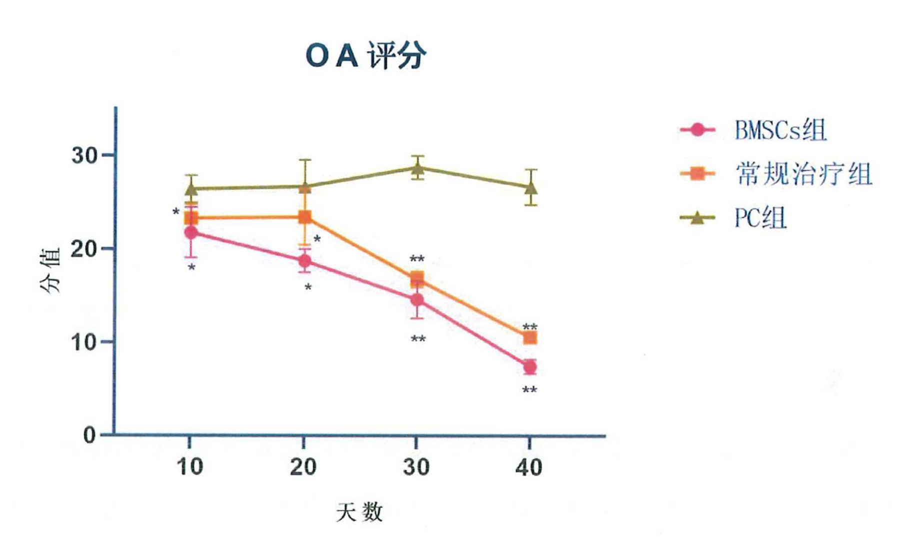


图 3-3 图中*表示组间差异显著，图中**示组间差异极显著。

Fig 3-3 * in the figure indicates significant differences between groups, and ** in the figure indicates extremely significant differences between groups.

Lequesne 评分，在造模成功后和治疗 10d、20d、30d、40d 四个阶段。每隔 10d 进行一次膝关节功能障碍以及疼痛等症状特征进行打分评定。具体评分细则按照局部反应、步态改变、关节活动、关节肿胀四个等级。局部反应、步态改变、关节活动都分别分为Ⅰ-Ⅳ 四个部分，关节肿胀分为Ⅰ-Ⅲ三个部分。

和正常犬只相比较中，各组实验模型犬在进行膝关节注射碘乙酸钠后都出现了明显的关节疼痛，并在后期发展成为严重的的关节炎症。当关节腔注射一定量的碘乙酸钠发展成为关节炎后，膝关节炎并不会随着时间的延长而有好转，在没有进行药物干预治疗时只会随着时间的延长而加重膝关节炎的病症（见图 3-3 和表 3-3）。

在本次实验中，在以不同的方式对实验犬进行治疗 40d 后实验犬的膝关节均都表现出了不同程度的改善。在治疗前，无论是 BMSCs 组、常规治疗组还是 PC 组的膝关节疼痛值都表现为最高值；

在 10d 时，疼痛值有所下降，PC 组显著高于 BMSCs 治疗组（$P<0.05$）、PC 组显著高于常规治疗组（$P<0.05$）。

在 20d 时，PC 组显著高于 BMSCs 治疗组（$P<0.05$）、PC 组显著高于常规治疗组（$P<0.05$），BMSCs 组和常规治疗组的疼痛值都有下降，BMSCs 组疼痛值下降更为明显。在 30d 时，PC 组极显著高于 BMSCs 治疗组（$P<0.01$）、PC 组极显著高于常规治疗组（$P<0.01$）。

在第 30d 的治疗疼痛值评分阶段中显示，常规药物治疗组的疼痛值与 10d、20d 相比较下降更为明显。

在 40d 时无论是 BMSCs 治疗组还是维他昔布治疗组与阳性对照组相比疼痛值都有明显的下降。PC 组极显著高于 BMSCs 治疗组（$P<0.01$）、PC 组极显著高于常规治疗组（$P<0.01$）（表 3-3）。

3.5 cCRP 指标结果判读

如表 3-4：显示在两组治疗组治疗到第一个阶段 10d 后与阳性对照组比较炎症指标均都下降到正常水平，10d、20d、30d、40d 炎症指标呈持续性下降。在第 40d 是指标下降到最低值。在 10d、20d、30d、40d 时 PC 组极显著高于 BMSCs 治疗组（$P<0.01$）、PC 组极显著高于常规治疗组（$P<0.01$）。

表 3-4 cCRP 指标结果判读

Table 3-4　Interpretation of cCRP index results

组别	例数	治疗值	治疗 10d	治疗 20d	治疗 30d	治疗 40d
BMSCs 组	3	11.92±0.43	9.18±0.88**	5.80±0.38**	2.18±1.11**	1.13±0.29**
常规治疗组	3	12.41±0.73	8.13±0.43**	4.55±0.39**	1.73±0.68**	1.03±0.15**
PC 组	3	11.56±1.60	14.47±1.29	12.28±0.92	11.82±0.75	7.20±1.23
NC 组	3	0.23±0.06	0.25±0.07	0.20±0.10	0.28±0.07	0.29±0.09

注：表中*表示组间差异显著 P<0.05，表中**示组间差异极显著 P<0.01。PC 组：阳性对照组、NC 组：阴性对照组。

Note: * in the table indicates significant P<0.05 difference between groups, and ** in the table indicates extremely significant P<0.01 difference between groups. PC group: positive control group, NC group: negative control group.

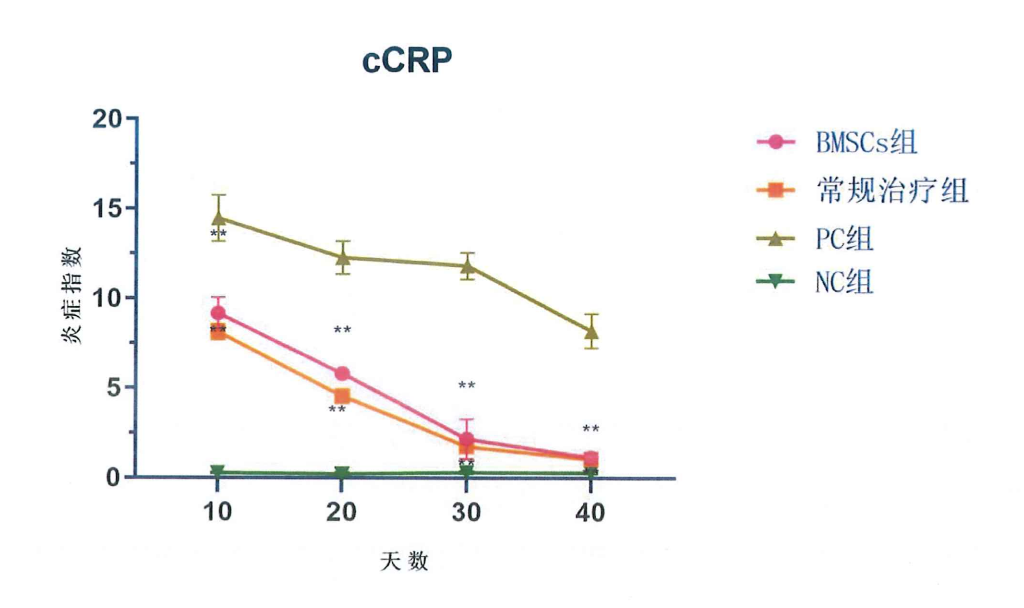


图 3-4 图中*表示组间差异显著，图中**示组间差异极显著。

Figure 3-4　* in the figure indicates significant differences between groups, and ** in the figure indicates extremely significant differences between groups.

经过 cCRP 测量后结果显示，在实验犬造模成功后在治疗前模型犬全身炎症反应显示为轻度炎症，两组治疗组的犬只经过 40d 治疗后炎症反应有了明显的降低。无论是维常规治疗组还是 BMSCs 组在治疗到第 10d 后炎症指标开始下降到正常范围（图 3-4 ），随后的 20d、30d、40d 炎症指标持续下降，PC 组因为没

有药物治疗的干预，炎症指标在 10d、20d、30d 时都显示为轻微炎症，在第 40d 炎症指标下降到正常范围，因此无论是 BMSCs 治疗或者是常规药物治疗组都对犬 OA 的恢复有比较好的恢复作用。在加快 OA 恢复速度上，BMSCs 治疗恢复速度，降低炎症反应上要优于常规药物维他昔布治疗（见图 3-4 和表 3-4）。

3.6 DR 检测结果

NC 对照组（图 3-5-NC）

PC 对照组（图 3-5-PC）

BMSCs 治疗前髌骨腹侧与滑车脊低密度间隙消失，提示髌骨腹侧与滑车脊中间软骨消失，缺失软骨呈不规则凹槽状，软骨表面不光滑，膝关节骨皮缺失，胫骨端关节骨密度下降

BMSCs 治疗 20 天后膝关节缺失软骨开始呈现逐步恢复的趋势，髌骨腹侧与滑车脊低密度间隙增加，提示髌骨腹侧与滑车脊中间软骨开始生长，同时膝关节骨皮质也逐步恢复，胫骨端关节软骨逐步恢复。（图 3-5-A）

BMSCs 治疗 40d 可以看见髌骨腹侧与滑车脊低密度间隙增加，提示髌骨腹侧与滑车脊中间软骨继续生长，膝骨关节缺失的骨皮质恢复，胫骨端关节骨密度基本恢复正常，剩下少量未恢复的低密度阴影也在增加，提示软骨组织缓慢恢复。（图 3-5-B）

常规药物治疗组显示治疗前胫骨髁低密度阴影缺失提示软骨关节缺失，缺失软骨呈不规则凹槽状，骨密度下降，骨皮质缺失。

治疗 20d 后显示少量低密度阴影提示软骨关节少量恢复，骨密度也少量恢复，但是缺损的骨皮质较严重。（图 3-5-C）

治疗 40d 后胫骨关节软骨继续恢复了一部分，髁骨关节缺失的骨皮质恢复部分，但是恢复比较缓慢，同样可以看见髁关节的部分低密度阴影关节软骨，髌骨腹侧与滑车脊低密度间隙增加，提示髌骨腹侧与滑车脊中间软骨继续生长。（图 3-5-D）

PC 对照组因为没药物所以在 MIA 的持续破坏下关节软骨无法自行修复，（图 3-5-PC）在关节骨皮质的缺损逐步增加，显示胫骨端关节胫骨端关节低密度阴影消失，提示关节软骨缺损缺损严重，同时髁关节骨皮质也出现了凹槽状缺失，提

示骨关节炎的加重。

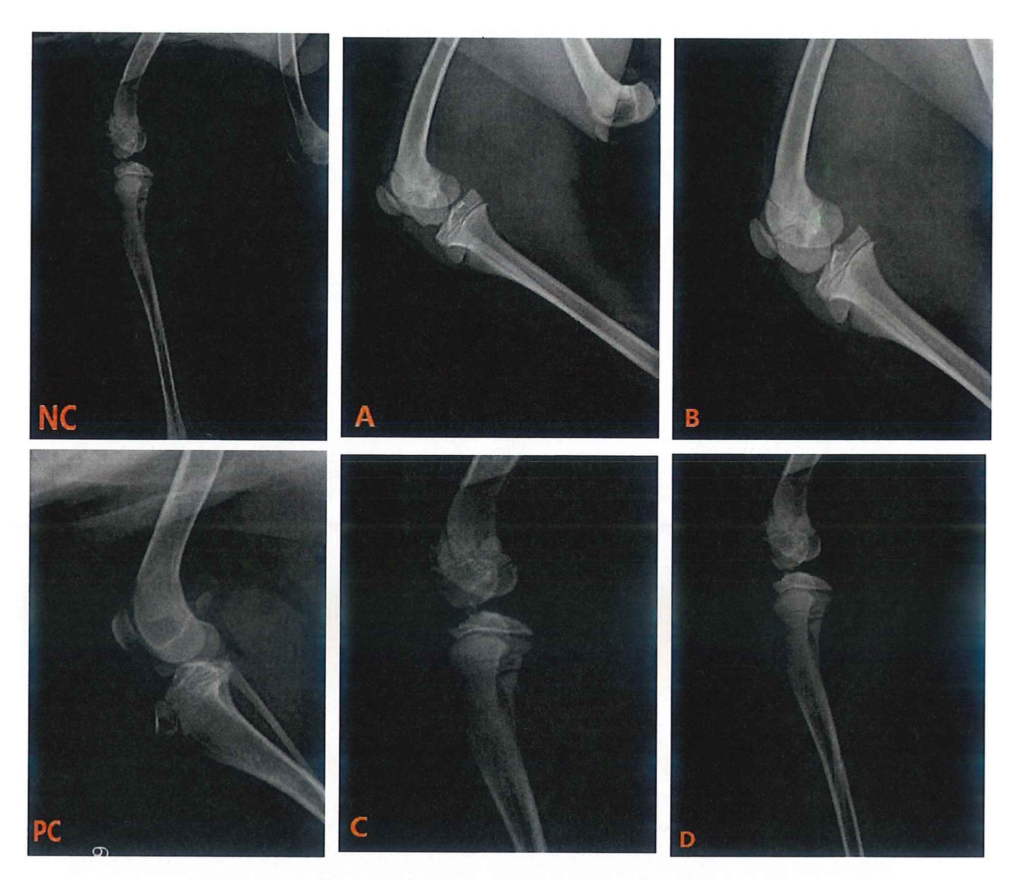


图 3-5 犬关节炎治疗后 X 线扫描图

注：NC:阴性对照组；PC:阳性对照组；(A)BMSCs 组治疗 20d 后；(B)BMSCs 组治疗 40d 后；(C)常规药物组治疗 20d 后；(D)常规药物组治疗 40d 后；

Fig.3-5 X-ray scan images of canine arthritis after treatment

Note: NC: negative control group; PC: positive control group; (A)BMSCs group after 20 days of treatment; (B)BMSCs group after 40 days of treatment; (C) After 20 days of treatment with conventional drugs; (D) After 40 days of treatment in the conventional drug group

3.7 病理学观察结果的治疗

3.7.1 膝关节组织的肉眼观察

通过解剖肉眼观察膝关节可见：正常对照组的髌骨表面光滑，滑车沟软骨面光滑，关节液清亮（3-6-NC）。在治疗前膝关节软骨缺失，膝关节骨皮质缺失，缺失软骨呈不规则凹槽状，软骨表面不光滑，骨密度下降表面不光滑，滑车沟槽

内软骨有破损。BMSCs 治疗组犬膝关节造模损伤部位（图 3-6--C）软骨逐渐恢复，周围浸润淡黄色炎性液体，髌骨凹槽处肉眼可见新生组织，新生的软骨组织从四周逐渐向中央恢复，关节液清亮透明；BMSCs 治疗组恢复情况比常规药物治疗恢复的情况好，常规药物治疗组仍可见少部分凹槽，软骨四周新生部分比较薄，仍能看见骨质，中央形成的新生组织是一个小突起（图 3-6-D）；PC 对照组在 40d 后因无药物的治疗，所以在 MIA 的持续破坏下肉眼可见的骨赘生物明显，软骨出现明显裂缝，滑车沟内软骨破损严重，髌骨表面不光滑（图 3-6-PC）。

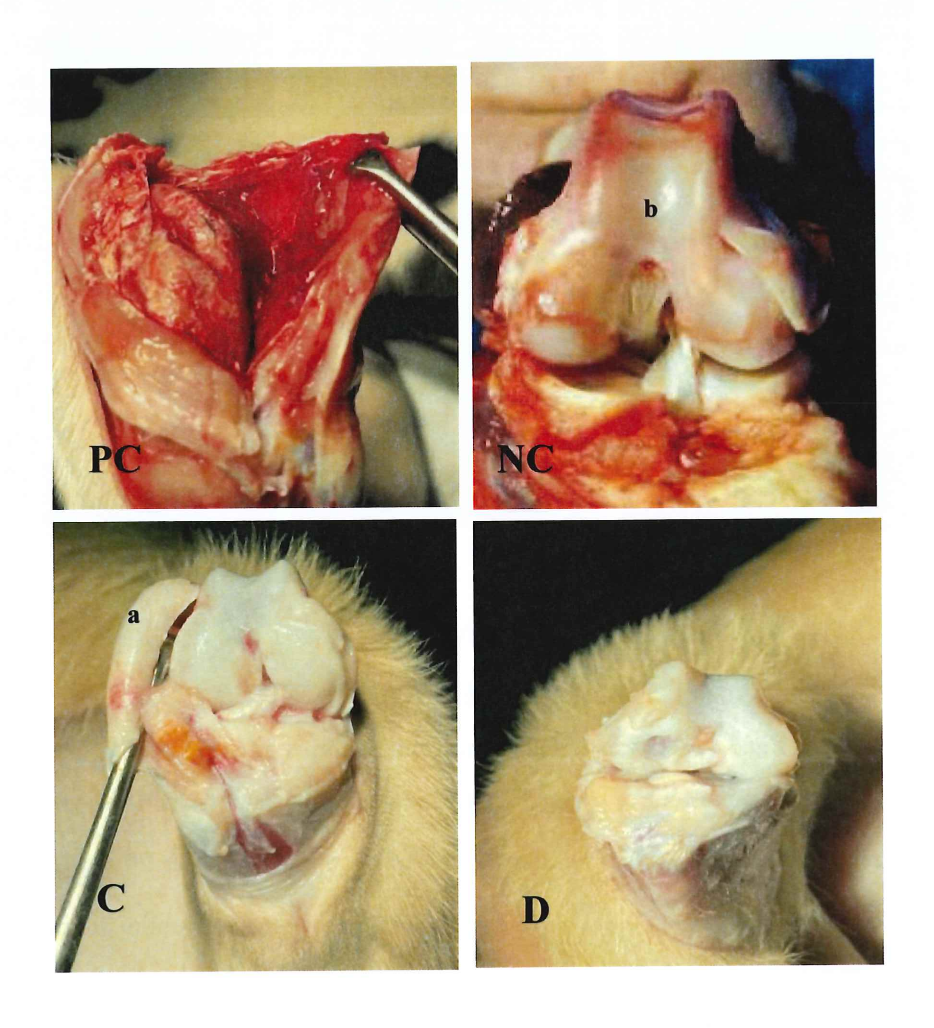


图 3-6 犬膝关节解剖图

注：PC:阳性对照组；NC:正常对照组关节；(C)BMSCs 治疗组关节；(D)药物治疗组关节；(a)髌骨，　(b)软骨。

Fig:3-6 Anatomy of canine knee joint

Note: PC: positive control group; NC: Normal control group joints; (C)BMSCs treatment group; (D) Joint in the drug treatment group; (a) patella, (b) cartilage.

3.7.2 治疗对软骨组织修复的影响

HE 染色观察可见：PC 组关节软骨层较薄，未见软骨样细胞，裂隙病变，软骨损伤程度严重，软骨层及软骨下组织出现明显的变性和崩解坏死,细胞数量增多且簇集分布严重，PC 组关节软骨切片箭头所指深色部分为过多钙盐沉淀（图 3-7-PC）。

NC 组为正常的关节软骨切片，关节切片表面光滑完整，图中软骨细胞分布均匀完整，关节软骨细胞形态及结构未见明显改变，细胞核仍为圆形或椭圆形（图 3-7-NC）。

BMSCs 治疗组软骨切片，图中 a 为新长出来的软骨细胞，随着软骨生长具有明显的软骨囊，软骨在囊内进行分裂，可见大量幼纤维细胞，细胞核明显（图 3-7-C）。

常规药物治疗组有新长出来的软骨细胞，细胞分布均匀，箭头所指为未修复完成的软骨层（图 3-7-D）软骨深层细胞规则而整齐紧密的排列，层次清晰，

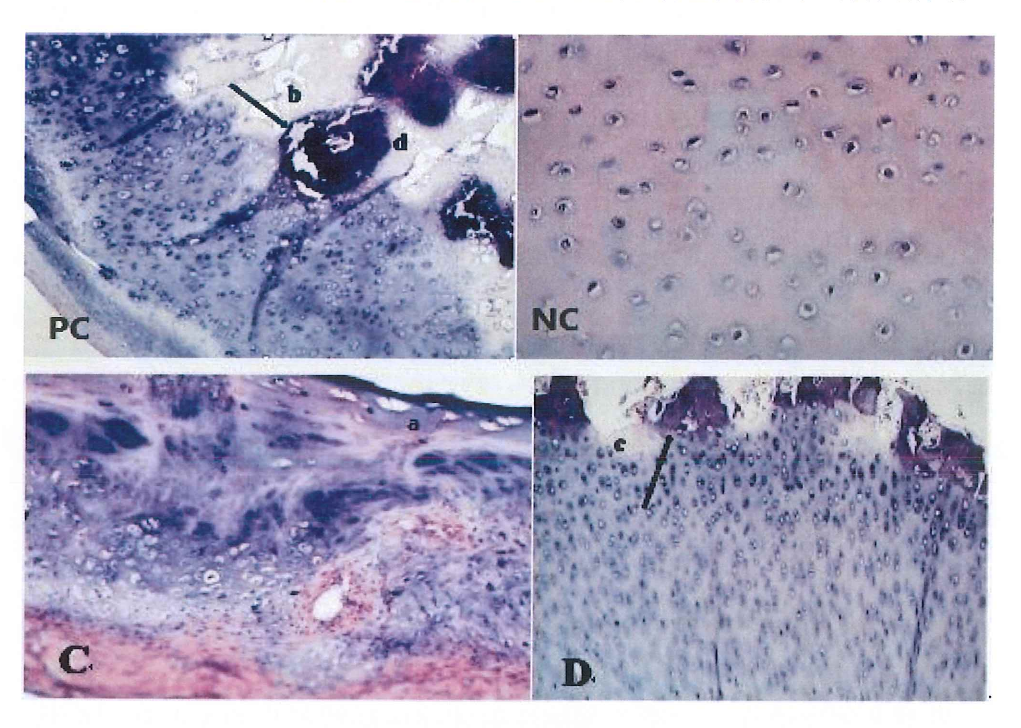


图 3-7 HE 染色观察

注：PC:阳性对照组；NC:阴性对照组；(C)BMSCs 治疗组关节软骨；（D）常规药物治疗组；(a)新生软骨层；(b)软骨裂隙病变；(c)未修复完成的软骨层；(d)钙盐沉淀。**(HE：200×)**

Fig3-7 HE Staining Observation

Note: PC:阳性对照组; NC: negative control group; (C) articular cartilage in BMSCs treatment group; (D) conventional drug therapy group; (a) the layer of new cartilage; (b) cartilage fissure lesions; (c) unrepaired layers of cartilage; (d) calcium salt precipitation. **(HE: 200×)**

4. 讨论

4.1 MIA 对膝关节软骨的损伤特点

目前，用碘乙酸钠进行关节腔注射是比较广泛流行的一种退行性骨关节炎造模药物，用来对于退行性骨关节炎的疼痛模型研究。碘乙酸钠模型研究和人类 OA 的病程发展类似，能够做到在一定程度上复刻人类 OA 的发病理展过程[91]，而且，经过碘乙酸钠造模后进行动物痛觉刺激测：刺激动物关节、刺激动物关节周围组织以诱发疼痛试以及行动行为测试、负重测试等都与人类 OA 类似，因此对人类 OA 后续的疾病研究可以提供一定程度的参照。

碘乙酸钠属于一种不可逆抑制剂，可以抑制关节软骨细胞中的甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）。GAPDH 是参与糖酵解的一种关键酶，正常的关节软骨会经过 GAPDH 参与糖酵解来进行代谢从而对软骨细胞来进行修复[92]，但是碘乙酸钠切断了细胞的三磷酸循环，让蛋白多糖的合成量减少 ，阻断了软骨细胞的自我糖酵解从而导致了软骨细胞无法正常恢复而逐渐凋亡[93-95]，软骨细胞的凋亡使得骨关节炎的愈发严重，是一种无法自愈的退行性病症。

碘乙酸钠犬只造模成功后其特征与人类 OA 具有共同病理学特征，在的蛋白多糖的过度糖酵解下，都会出现关节软骨变薄。骨密度下降。关节表面出现摩擦音，骨赘生物的形成，软骨与软骨下骨质分离，软骨下骨质增生，滑膜增后等特征。从组织学观察以及大体解剖观察，碘乙酸钠造模相对于手术认为破坏膝关节造模相比较，碘乙酸钠造模不对实验犬造成伤口也不会造成因手术认为破坏后的伤口感染，通过注射器注射后形成的 OA 更符合预期。

4.2 MIA 造模后的炎症反应

模型犬需要进行三次碘乙酸钠注射才能成功模拟出 OA 的典型症状，但是在造模过程中发现，当进行第二次碘乙酸钠膝关节注射后，在模型犬身体吸收了碘乙酸钠后，所有造模犬只均出现咳嗽、有痰的症状（碘乙酸钠注射剂量越高，出现咳嗽的症状越明显）。在造模成功后的两周内每天都会出现咳嗽、有痰的症状。把成功造模的犬分为骨髓间充质干细胞治疗组和常规药物维他昔布治疗组后，都

搭配常规消炎药物氨苄西林钠进行配合治疗，在治疗 5d 后咳嗽症状逐渐消失。

碘乙酸钠造模成功后膝关节出现明显的炎症反应（红肿热痛），模型犬行动出现障碍，碘乙酸钠造模后模型犬出现了不同程度的咯痰咳嗽现象，因此在治疗前的 cCRP 检测显示模型犬出现轻微炎症反应，血常规检测同样表现出白细胞升高和中性粒细胞数目升高的情况。在治疗后的 10d 和第 20d 时血常规检测 同样显示白细胞数目不在正常范围内。无论是常规药物治疗组还是骨髓间充质干细胞治疗组的血常规白细胞指数都是在第 30d 时开始下降到正常范围。

碘乙酸钠可以抑制关节软骨细胞中的甘油醛-3-磷酸脱氢酶，是一种不可逆的抑制剂，能够阻断软骨细胞的自我糖酵解从而让关节软骨细胞无法正常代谢，无法自我软骨修复造成了退行性骨关节炎，但是目前碘乙酸钠造模 OA 后会引起的咳嗽作用机理尚不明确。但是通过碘乙酸钠对中华田园犬进行 OA 造模后得出结论，碘乙酸钠可以成功在犬膝关节在造出退行性骨关节炎模型。

4.3 常规治疗药物的选择

犬只骨关节炎常用药物一般临床上选用口服非甾体类抗炎药，非甾体类抗炎药大致可以分为 4 种：Cox-1 高选择性抑制药、Cox-1 低选择性抑制药、Cox 无选择性药物、Cox-2 选择性抑制药物，此类药品可以减少前列腺素的合成，抑制环氧酶起到抗炎止痛解热的功效，临床犬常用的非甾体类口服抗炎药以及用法用量（表 4-1）。

表 4-1 常用非甾体类药物

Table 4-1Common NSAIDs

药物名称	剂量
非甾体类抗炎药物(NSAIDs)	
乙酰水杨酸(Acetylsalicylic acid)	10～20 mg/kg PO q 8～12 h
卡洛芬(Carprofen)	2.2 mg/kg PO q 12 h
地拉考昔(Deracoxib)	1～2 mg/kg PO q 24 h
依托度酸(Etodolac)	10～15 mg/kg PO q 24 h
非罗考昔(Firocoxib)	5 mg/kg PO q 24 h
美洛昔康(Meloxicam)	首剂量为 0.2 mg/kg PO,然后 0. 1mg/kg POq24h
吡罗昔康(Piroxicam)	0.3 mg/kg PO q 48 h
维他昔布（Vitacoxobb Chewable Tablets）	2mg/kg PO q 24h

注：IM 肌肉注射；PO 口服

Notes: IM intramuscular injection; PO oral

非甾体类口服抗炎药自国际上被推选为骨关节炎患者局部炎症不明显用药或者初诊时骨关节炎症状明显的患者用药。但是非甾体类抗炎口服药在服用过程中会有副作用，产生的副作用主要包括：心血管损害、肾脏损害、胃肠道的损害，在临床使用中，NSAIDs出现胃肠道反应引起呕吐的情况比较多，因此合理的选择与使用NSAIDs是很重要的一环。如果患病动物患有其他严重的基础病或者胃溃疡一类的肠道疾病时在选择NSAIDs更加需要谨慎。因此根据大量的临床使用实例和药效学、药动学相比较本次实验选择的NSAIDs治疗组用药为维他昔布。

维他昔布是非甾体类抗炎药（NSAIDs）中的选择性环氧酶-2抑制剂。环氧酶-1负责維持基本的生理过程（例如血小板凝聚、胃黏膜保护、肾灌注），环氧酶-2负责合成炎性介质。NSAIDs的抗炎镇痛作用与抑制COX-2的活性有关，而胃肠道及血液系統等不良反应与抑制COX-1的活性有关。维他者布通过选择性抑制COX-2来阻断花生四烯酸合成前列腺素而发挥作用。犬体外全血试验结果表明，维他昔布对COX-2活性抑制的IC50为0.34ug .ml^{-1}，对COX-1活性抑制的IC50为19.40ug.ml^{-1}，对COX-2的活性抑制具有洗择性（IC50COX-1与IC50COX-2比值为56.96）。在治疗浓度下维他昔布对COX-1没有抑制作用，因此，胃防道不良反应发生率明显减少。

比格犬单次伺喂食物前内服30mg规格的维他昔布咀嚼片（相当于2.5mg/kg体重），血浆消除半衰期（$t_{1/2}$）为5.87h;血浆清除率（CL）为5.12L·kg^{-1}h^{-1}；表观分布容积（V）为53.89 L·kg^{-1};比格犬单次伺喂食物后内服30mg规格的维他昔布咀嚼片，消除半衰期（$t_{1/2}$）为3.32h；血浆清除率（CL)为1.20L·kg^{-1}h^{-1}，表观分布容积(V)为5.49L·Kg^{-1}，维他昔布饲喂食物后给药的AUE是禁食给药状态下的4.2倍，因此建议饲喂食物后给药。比格犬连续7日给药在体内药物量无明显增加或减少，无药物蓄积和肝药酶诱导作用。本药物主要经过肝脏代谢，主要代谢产物为羧基代谢物，主要通过粪便和尿液排泄。因此在用药安全上选择维他昔布作为常规药物治疗组的用药更为合理。

4.4 BMSCs治疗OA的可行性

软骨是一种由软骨细胞构成的组织，根据透明基质中的纤维不同，可分为透明软骨、弹性软骨和纤维软骨三种类型。健康的关节需要具备良好的软骨功能。

软骨细胞构成了光滑的弹性组织，分布于软骨腔和软骨陷窝内。关节软骨由上层、中层、深层和钙化软骨四层组成，且没有神经或血管。它主要依靠滑膜液和滑膜层周围的动脉分支获得营养，表面为褶皱，中心部位较厚，边缘则变薄，以适应关节的运动特性。软骨细胞控制着关节软骨的大部分结构和功能，通过调节细胞外基质(ECM)的替换，维护组织的稳定性。由于软骨细胞的功能障碍，可能导致退行性疾病(OA)的发生[96-97]。多能干细胞(MSCs)被证明是治疗 OA 等肌肉骨骼退行性疾病的最佳再生细胞疗法。Jose M. lamo -espinosa 等人的研究表明，髓质间充质干细胞可改善 OA 患者的症状和运动功能[98]。

骨关节炎是一种常见的疾病。临床检查上需要一种准确的方法来尽早准确诊断这种疾病。DR 检测、炎症检测、血液常规检测、关节镜探查超声和 CT 通常用于可视化检测诊所的关节损伤。DR 检测可用于评估关节成骨和关节间隙以及低密度关节软骨变化，是对关节损伤的常规检查，近年来，超生的高频运用在关节损伤中的也得到了更多的关注。高频超声检查在评估复杂的关节(如膝关节)中能够很好的补充临床 X 射线的检查

在本实验中，通过 MIA 造模骨关节炎，采用 DR 检测、血常规检测、关节炎临床评分、HE 切片染色，炎症检测综合评估 BMSCs 对骨关节炎的软骨损伤治疗效果后结果表明，BMSCs 对炎症的消除有明显的疗效，BMSCs 组 cCRP 与 PC 组 cCRP40d 治疗效果相比较为差异极显著性(P<0.01)，血常规检测中表示炎症反应的 WBC 数目 BMSCs 组与 PC 组相比较为差异极显著性(P<0.01），在可视化检测中，经过 40d 治疗后 DR 探查可以清楚的看见膝关节内低密度阴影恢复，提示关节软骨经过 BMSCs 的治疗已经恢复，在 HE 切片染色中观察，PC 组与 BMSCs 治疗组有明显差异，BMSCs 治疗组 HE 染色切片经过干细胞治疗可看见软骨细胞再生，随着软骨的生长具有明显的软骨囊，细胞再囊内进行分类，形成三到八个细胞群，同时可见大量的幼稚纤维细胞。向 OA 关节注射 BMSCs 后，炎症细胞因子的滑液液水平降低[99]。这些发现表明，BM-MSCs 在治疗 OA 中的潜在双重作用，即这些细胞不仅促进受损软骨的再生，还有助于关节稳态，BM-MSC 还具有与抗炎和生长因子的产生相关的免疫调节和营养作用[100]，这可能会改善 OA 的炎症和分解代谢方面。由此可说明 BMSCs 对骨关节炎治疗的可行性成立，BMSCs 可以加速软骨细胞的再生，促进软骨细胞生长，对于骨关节

炎的治疗是一种优先选择的治疗方案。

4.5 治疗效果比较

骨关节炎在目前被认为是一种持续性炎症的疾病，在经过碘乙酸钠造模后各组实验犬软骨组织中的软骨细胞层明显减少，在骨关节炎早期，因为碘乙酸钠的破坏，膝关节中会持续的无法自我修复，在软骨细胞的不断自我死亡后同样会持续性的在膝关节处产生炎症。在实验中没有经过治疗的阳性对照组的膝关节跛行一直持续，并无好转甚至出现了随着时间的增加，阳性对照组右后腿的跛行越发严重，并且出现了膝关节僵直，无法正常屈伸的情况。虽然没有经过治疗的阳性对照组在后期身体炎症指标逐渐下降，但是经过关节软骨采样后显示，碘乙酸钠在犬膝关节中会持续的破坏关节软骨细胞，导致严重的不可逆性病变，骨赘生物的增多，髌骨表面不光滑，滑车脊和滑车槽不清晰，软骨下骨增厚，软骨不完整，有较深的裂缝。

在骨髓间充质干细胞治疗组、维他昔布治疗组的治疗结果显示，经过治疗后的犬膝关节软骨细胞都在逐步的恢复，关节疼痛值也在逐步的减少，经过血常规和 cCRP 的检测同样表明犬退行性膝关节炎的炎症在逐步的恢复正常。经过治疗后，两个治疗组犬只的步行、跑步姿态跳跃姿态逐步的恢复正常，跛行状态基本消失。虽然经过治疗后犬只的关节活动逐步恢复正常了，但是犬只的弹跳能力减弱，偶尔会在奔跑中出现抬脚现象，通过抽提试验检查为弱阳性，表明在造模过程中，犬十字韧带松弛，韧性不佳，碘乙酸钠造模对犬十字韧带有一定的损伤。

虽然骨髓间充质干细胞治疗组和维他昔布治疗组最后都明显改善了实验犬只的 OA 情况，但是两组治疗过程上还是有明显差异：(1)骨髓间充质干细胞治疗组在进行关节腔注射后，实验犬的体温会出现高出正常范围值，维他昔布治疗组则不会出现体温升高的症状；(2)在止痛方面，维他昔布属于镇痛抗炎类药物，所以在减少 OA 疼痛方面，维他昔布表现出了更好的效果；(3)骨髓间充质干细胞是直接作用于关节软骨的，因此在关节软骨的恢复速度上要快于口服药维他昔布。

4.6 预后

经过 40d 的治疗，又后续 15d 观察，BMSCs 治疗组与常规药物治疗组再次

验血，炎症指标没有上升，血常规指数正常，BMSCs治疗组犬只的基本行动无明显异常，行走姿态正常，常规药物治疗组会偶尔出现奔跑过快时右后腿点地的症状。

5.结论

BMSCs进行膝关注射治疗和服用非甾体类药物维他昔布都可以起到减轻OA炎症反应，改善OA的状况，同时促进软骨细胞再生。

两组模型相比较下，BMSCs可以有效促进软骨细胞的生长，缓解OA诱导的退行性软骨退化，在加快软骨细胞进行修复上的速度都要优于维他昔布治疗组的恢复速度，在降低炎症的速度上也快于维他昔布治疗组。

参考文献

[1] 蔡金宏,林春博,杨渊.间充质干细胞分离方法的研究与进展[J].中国组织工程研究,2014,18(45):7375-7380.

[2] Friedenstein A J,Gorskaja J F,Kulagina N N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs.[J]. Experimental hematology,1976,4(5)

[3] Banu Iskender. The Active Compound Thymoquinone Alters Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells via Modulation of Intracellular Signaling.[J]. Medeniyet medical journal,2022,37(1).

[4] Guercio Annalisa,Di Marco Patrizia,Casella Stefania,Cannella Vincenza,Russotto Laura,Purpari Giuseppa,Di Bella Santina,Piccione Giuseppe. Production of canine mesenchymal stem cells from adipose tissue and their application in dogs with chronic osteoarthritis of the humeroradial joints.[J]. Cell biology international,2012,36(2).

[5] Barry Frank P,Murphy J Mary. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization.[J]. The international journal of biochemistry & cell biology,2004,36(4).

[6] Teeple Erin,Jay Gregory D,Elsaid Khaled A,Fleming Braden C. Animal models of osteoarthritis: challenges of model selection and analysis.[J]. The AAPS journal,2013,15(2).

[7] 夏菁. 脂肪间充质干细胞移植治疗犬心肌梗死后心力衰竭的实验研究[D].中国人民解放军军医进修学院,2006.

[8] Garcia-Honduvilla N, Cifuentes A, Ortega MA, et al. High sensitivity of human adipose stem cells to differentiate into myofibroblasts in the presence of C. aspersa Egg Extract[J]. Stem Cells Int, 2017, 2017: 9142493.

[9] Marei, EL-Gamal A, Althani A, et al. Cholinergic and dopaminergic neuronal differentiation of human adipose tissue derived mesenchymal stem cells[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(2): 936-945.

[10] Weissman I L, Anderson D J, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations[J]. Annual Review of Cell & Developmental Biology, 2001, 17(1): 387-387.

[11] 李珂雅,石桂英,高舒平,等.小鼠、大鼠、食蟹猴与人的脂肪干细胞分离培养方法和生物学特性的比较分析[J].中国比较医学杂志, 2019, 29(6):1-14.

[12] 郑明魁 ."人脐带间充质干细胞来源外泌体降低脊髓损伤后血脊髓屏障的通透性." 中国组织工程研究 ..

[13] 石俊,关振群,王训霞,等.牙龈成纤维细胞诱导分化神经细胞的可行性[J].中国老年学杂志,2023,43(02):365-370.

[14] 张扬,秦洁,张宏,等.间充质干细胞在 2 型糖尿病治疗中的应用[J].吉林医学,2023,44(01):187-193.

[15] 及时雨,赵培超,齐平建,等.隐丹参酮体外诱导骨髓间充质干细胞向神经细胞分化的研究[J].中华实验外科杂志,2018,35(06):1173.

[16] Ringe J, Leinhase I, Stich S, et al.Human mastoid periosteum-derived stem cells: promising candidates for skeletal tissue engineering[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2008, 2: 136-146.

[17] Blanc K. Mesenchymal stromal cells: Tissue repair and immune modulation[J]. Cytotherapy, 2006, 8(6): 559-561.

[18] Friedenstein A J, GorskajaJ F, Kulagina N N.Fibroblastprecursors in normal and irradiated mouse hematopoiticorgans[J]. ExpHematol, 1976, 4: 267-274.

[19] Choi J R, Yong K W, Choi J Y. Effects of mechanical loading on human mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(3): 1913-1928

[20] 胡克苏,祁俊,张云,等.人脐带间充质干细胞对大鼠烧伤的治疗作用[J].江苏医药,2013,39(15):1759-1761.

[21] 高振橙,刘欣.间充质干细胞外泌体在神经系统疾病修复过程中的作用与应用[J].中国组织工程研究,2020,24(19):3048-3054.

[22] 张猛. 干细胞膜伪装聚多巴胺纳米复合材料治疗骨肿瘤的研究[D].吉林大学,2021.

[23] Wang Ruihua,Wei Wen,Rong Shuling,Wang Ting,Li Bao. Intravenous injection of SDF-1α-overexpressing bone marrow mesenchymal stem cells has a potential protective effect on myocardial ischemia in mice.[J]. Current stem cell research & therapy,2022.

[24] Becerra-Bayona S.M.,Solarte-David V.A.,Sossa C.L.,Mateus L.C.,Pereira J.,Ardila-Roa A.K.,Arango-Rodriguez M.L.. Security and efficacy of intradermal injection of mesenchymal stem cells derivatives on chronic diabetic foot ulcers: a randomized controlled clinical trial[J]. Cytotherapy,2021,23(5S).

[25] 李捷,白利鹏,陈曦,等.犬骨髓间充质干细胞的体外分离培养及鉴定[J].浙江农业学报,2017,29(05):751-759.

[26] 廖新爱,蔡丹妮,游若兰.小鼠骨髓间充质干细胞分离方法的比较与探讨[J/OL].中国试验动物学报

[27] 张丹. LPS 诱导细胞自噬调控长牡蛎血淋巴细胞增殖的机制初探[D].大连海洋大学,2022.

[28] 于晓龙,常青,褚佳星,等.不同浓度的窦房结细胞裂解液对兔骨髓间充质干细胞的诱导分化作用[J].中国循证心血管医学杂志,2022,14(09):1073-1075+1079.

[29] 任莉. 木香烃内酯对骨髓间充质干细胞成骨性分化的影响及其机制研究[D].兰州理

工大学,2021.

[30] 陈贵南,洪海惠,罗爱芳.骨盆骨髓弥散加权成像特征在男性女性及不同年龄段的差异研究[J].中国实验诊断学,2022,26(12):1800-1803.

[31] 许晓婷,胡文举,陈晓佩,等.兔骨髓间充质干细胞体外分离培养及冻存[J].西北农业学报,2014,23(11):17-23.

[32] Mazini L, Rochette L, Admou B, Amal S, Malka G. Hopes and Limits of Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) and Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in Wound Healing. Int J Mol Sci. 2020 Feb 14;21(4):1306.

[33] 周赛,江洪波,陈大明.不同研发阶段的骨关节炎治疗药物开发进展[J/OL].生命的化学:1-8[2023-03-11].

[34] 袁蓉,李梓涵,黄美雯,等.川芎-赤芍药对干预心肌梗死合并动脉粥样硬化复合模型的circRNA/lncRNA 表达谱研究[J/OL].中国中药杂志:1-16[2023-03-11].

[35] 张耀天,崔军,刘晶毅.miR-889-3p 靶向 Runx2 抑制脂肪间充质干细胞的成骨分化[J].中国组织工程研究,2023,27(19):3023-3028.

[36] 巴依尔才次克,王彦梅,朱艳萍.间充质干细胞移植改善脑室周围白质软化损伤作用的研究[J].试验动物科学,2021,38(02):22-29.

[37] Kim WS, Park BS, Sung JH, Yang JM, Park SB, Kwak SJ, Park JS. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. J Dermatol Sci. 2007 Oct;48(1):15-24.

[38] 李岩,张钰堃,曹贵方.犬间充质干细胞的研究进展和临床应用[J].畜牧与饲料科学,2015,36(10):77-81.2015.10.027.

[39] Zhou Guanzhou,Tian Ailing,Yi Xin,Fan Lufeng,Shao Wenchong,Wu Han,Sun Nianfeng. Study on a 3D-Bioprinted Tissue Model of Self-Assembled Nanopeptide Hydrogels Combined With Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells.[J]. Frontiers in bioengineering and biotechnology,2021,9.

[40] De Ugarte DA，Morizono K，Elbarbary A，et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow [J]. Cells Tissues Organs，2003，174（3):101-109.

[41] 金海燕,刘毅.同源框基因在脂肪组织与间充质干细胞中的表达与调控的研究进展[J].中国美容整形外科杂志,2022,33(12):759-761+771.

[42] 韩冬梅,何伍,韦薇,等.人源干细胞产品的药学评价考虑[J].中国新药杂志,2023,32(02):148-153.

[43] 闫增强，评估不同冻存保护剂对人脐带间充质干细胞活力的研究．内蒙古自治区，内蒙古包钢医院,2017-05-30.

[44] 赵子葳,李俊琴,牛旭平.间充质干细胞移植治疗银屑病研究进展[J].中国麻风皮肤病

杂志,2022,38(07):488-492.

[45] Yaozhen Chen,Xiangyang Qin,Qunxing An,Jing Yi,Fan Feng,Dandan Yin,Ning An,Zheng Liu,Lihong Weng,Shouwen Chen,Xingbin Hu,Wen Yin. Mesenchymal Stromal Cells Directly Promote Inflammation by Canonical NLRP3 and Non-canonical Caspase-11 Inflammasomes[J]. EBioMedicine,2018,32.

[46] 李苗苗. CD73~+人脂肪间充质干细胞通过 CD73/腺苷轴促进心肌修复[D].新乡医学院,2020.

[47] Andrukhov Oleh."Toll-Like Receptors and Dental Mesenchymal Stromal Cells ." Frontiers in Oral Health 2.(2021)..

[48] 秦菊,江滨,陆柏江.间充质干细胞介导白细胞介素因子调节免疫反应的机制研究[J].医学研究杂志,2023,52(02):15-19.

[49] 梁春兰,师齐,刘莲.间充质干细胞来源的外泌体与眼免疫性疾病[J].医学研究杂志,2022,51(09):171-174.

[50] Miyara M, Ito Y, Sakaguchi S. TREG-cell therapies for autoimmune rheumatic diseases. Nat Rev Rheumatol. 2014;10(9):543-551.

[51] Li S, Xie Q, Zeng Y, et al. A naturally occurring CD8(+)CD122(+) T-cell subset as a memory-like Treg family. Cell Mol Immunol. 2014;11(4):326-331.

[52] Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. Annu Rev Immunol. 2012;30:221-241

[53] Vieira-Potter VJ. Inflammation and macrophage modulation in adipose tissues. Cell Microbiol. 2014;16(10):1484-1492。

[54] Garcia-Gonzalez P, Ubilla-Olguin G, Catalan D, Schinnerling K, Aguillon JC. Tolerogenic dendritic cells for reprogramming of lymphocyte responses in autoimmune diseases. Autoimmun Rev. 2016;15(11):1071-1080.

[55] Jiang W, Xu J. Immune modulation by mesenchymal stem cells. Cell Prolif. 2020 Jan;53(1):e12712. 2019

[56] Krampera M. Mesenchymal stromal cell 'licensing': a multistep process. Leukemia. 2011;25(9):1408-1414.

[57] 谢犇,秦庆庆,杨杜斌.(2022).骨髓间充质干细胞成软骨分化机制研究进展.中国运动医学杂志(04),314-319.

[58] 黎柏军,郑洁,杨锋.骨关节炎滑膜病变机制研究进展[J].中国骨与关节杂志,2022,11(10):777-782.

[59] 刘玉杰,朱鹏飞,党丽君.自体基质诱导软骨生成术与外侧韧带稳定术治疗距骨骨软骨损伤合并踝关节不稳效果分析[J].重庆医学,2022,51(09):1520-1523+1529.

[60] 朱保红,柴喜平,李盛华.补肾活血中药治疗膝关节骨性关节炎作用机制概述[J].实用中医药杂志,2023,39(01):211-214.

[61] 孙金明.犬的退行性骨关节病[J].中国畜禽种业，2011,08： 127.

[62] H Akkiraju， A Nohe. Role of Chondrocytes in Cartilage Formation, Progression of Osteoarthritis and Cartilage Regeneration[J]. J Dev Biol，2015，4(3)：177-192.

[63] Kim J, Xu M, Xo R, Mates A, Wilson GL, Pearsall AW 4th, Grishko V. Mitochondrial DNA damage is involved in apoptosis caused by pro-inflammatory cytokines in human OA chondrocytes. Osteoarthritis Cartilage. 2010 Mar;18(3):424-32.

[64] Price JS, Waters JG, Darrah C, et al. The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis ［J］. Aging Cell, 2002, 1(1): 57-65.

[65] Blaney Davidson EN, Remst DF, Vitters EL, et al. Increase in ALK1/ALK5 ratio as a cause for elevated MMP-13 expression in osteoarthritis in humans and mice［J］. J Immunol, 2009, 182 (12): 7937-7945

[66] 尹志强,潘惟丽,金昊,等.(2016).骨性关节炎病因的研究进展. 现代生物医学进展(07),1369-1371+1389.

[67] Conde J, Scotece M, Gómez R, et al. Adipokines and osteoarthritis: novel molecules involved in the pathogenesis and progression of disease ［J］. Arthritis, 2011, 2011: 203901.

[68] Kapoor M, Martel - Pelletier J, Lajeunesse D, et al. Role of proin- flammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis ［J］. Nat Rev Rheumatol, 2011, 7(1): 33-42.

[69] Roos EM. Joint injury causes knee osteoarthritis in young adults ［J］. Curr Opin Rheumatol, 2005, 17(2): 195-200.

[70] Sernert N, Helmers J, Kartus C, et al. Knee -laxity measurements examined by a lefthand and a right-hand-dominant physiothera- pist, in patients with anterior cruciate ligament injuries and healthy controls ［J］. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2007, 15(10): 1181-1186.

[71] Lieberthal J, Sambamurthy N, Scanzello CR. Inflammation in joint injury and post - traumatic osteoarthritis ［J］. Osteoarthr Cartil, 2015, 23(11): 1825-1834

[72] Hämäläinen S, Solovieva S, Vehmas T, et al. Genetic influences on hand osteoarthritis in Finnish women--a replication study of candi- date genes［J］. PLoS ONE, 2014, 9(5): e97417.

[73] Zhai G, Hart DJ, Kato BS, et al. Genetic influence on the pro- gression of radiographic knee osteoarthritis: a longitudinal twin study ［J］. Osteoarthr Cartil, 2007, 15(2): 222-225.

[74] Cuervo B, Rubio M, Sopena J, Carrillo J.M, Cugat R, Dominguez J.M, Vilar J, Morales M, Cugat R, Carrillo J.M. Hip osteoarthritis in dogs: a randomized study using mesenchymal stem cells from adipose tissue and plasma rich in growth factors. Int. J. Mol. Sci.

2014;15(8):13437 – 13460.

[75] Tsai S, Huang Y, Chueh L, Yeh L, Lin C. Intra-articular transplantation of porcine adipose-derived stem cells for the treatment of canine osteoarthritis: a pilot study. World J. Transplant. 2014;4(3):196.

[76] Shah K, Drury T, Roic I, Hansen P, Malin M, Boyd R, Sumer H, Ferguson R. Outcome of allogeneic adult stem cell therapy in dogs suffering from osteoarthritis and other joint defects. Stem Cells Int. 2018;2018:1 – 7.

[77] Peroni J.F, Borjesson D.L. Antiinflammatory and immunomodulatory activities of stem cells. Vet. Clin. North Am. Equine Pract. 2011;27(2):351–362.

[78] Maggini J, Mirkin G, Bognanni I, Holmberg J, Piazzón I.M, Nepomnaschy I, Costa H, Cañones C, Raiden S, Vermeulen M, Geffner J.R. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. PLoS One. 2010;5(2):1–13.

[79] Kim N, Cho S.G. New strategies for overcoming limitations of mesenchymal stem cell-based immune modulation. Int. J. Stem Cells. 2015;8(1):54–68.

[80] Chow L, Johnson V, Coy J, Regan D, Dow S. Mechanisms of immune suppression utilized by canine adipose and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Stem Cells Dev. 2017;26(5):374–389.

[81] Arnhold S, Elashry M.I, Klymiuk M.C, Wenisch S. Biological macromolecules and mesenchymal stem cells: basic research for regenerative therapies in veterinary medicine. Int. J. Biol. Macromol. 2019;123:889–899.

[82] Peroni J.F, Borjesson D.L. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of stem cells. Vet. Clin. North Am. Equine Pract. 2011;27(2):351–362.

[83] Chow L, Johnson V, Coy J, Regan D, Dow S. Mechanisms of immune suppression utilized by canine adipose and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Stem Cells Dev. 2017;26(5):374–389.

[84] Gibson M.A, Brown S.G, Brown N.O. Semitendinosus myopathy and treatment with adipose-derived stem cells in working German shepherd police dogs. Can. Vet. J. 2017;58(4):241–246.

[85] Muir P, Hans E.C, Racette M, Volstad N, Sample S.J, Heaton C, Holzman G, Schaefer S.L, Bloom D.D, Bleedom J.A, Hao Z, Amene E, Suresh M, Hematti P. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells modulate molecular markers of inflammation in dogs with cruciate ligament rupture. PLoS One. 2016;11(8):1–21

[86] Lee E, Kim A, Lee E, Park J, Lee M, Hwang M, Kim C, Kim S, Jeong K. Therapeutic

Acid in the Treatment of Knee Osteoarthritis: Multicenter Randomized Controlled Clinical Trial (Phase I/II)[J]. J Transl Med, 2016,1(14)：246.

[99] 李德达，李世民，尚天裕.关节软骨愈合和再生研究的现代进展(一)[J].中国骨伤，2001，14 (8)：497-500.

[100] Charles W. Archer, Philippa Francis-West. The chondrocyte[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology , 2003, 35(2003)：401-404.

effects of mouse adipose-derived stem cells and losartan in the skeletal muscle of injured Mdx mice. Cell Transplant. 2015;24:939–953.

[87] Tsai S, Huang Y, Chueh L, Yeh L, Lin C. Intra-articular transplantation of porcine adipose-derived stem cells for the treatment of canine osteoarthritis: a pilot study. World J. Transplant. 2014;4(3):196.

[88] Daems R, Hecke L, Van Schwarzkopf I, Depuydt E, Broeckx S.Y, David M, Beerts C, Vandekerckhove P, Spaas J.H. A feasibility study on the use of equine chondrogenic induced mesenchymal stem cells as a treatment for natural occurring osteoarthritis in dogs. Stem Cells Int. 2019;6:1–11.

[89] Gibson M.A, Brown S.G, Brown N.O. Semitendinosus myopathy and treatment with adipose-derived stem cells in working German shepherd police dogs. Can. Vet. J. 2017;58(4):241–246.

[90] Kang MH,Park HM. Evaluation of adverse reactions in dogs following intravenous mesenchymal stem cell transplantation. Acta Vet Scand.2014;56:16.

[91] V. Neugebauer, J.S. Han, H. Adwanikar, et al. Techniques for assessing knee joint pain in arthritis, Molecular pain, 3 (2007), 8

[92] D. A. Kalbhen. Chemical model of osteoarthritis--a pharmacological evaluation, J Rheumatol, 14 Spec No (1987), 130-131.

[93] J. Femihough, C. Gentry, M. Malcangio, et al. Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee, Pain, 112 (2004), 83-93.

[94] Guingamp, P. Gegout-Pottie, L. Philippe, et al. Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. Arthritis Rheum, 40 (1997). 1670-1679.

[95] I.R. Kobayashi K, Sumichika H. Sodium lodoacctatc-Induced Experimental Osteoarthritis and Associated Pain Model in Rats, Veterinary Medical Science (2003), 65:1195-1199.

[96] Frisbie DD, Kisiday JD, Kawcak CE, Werpy NM, McIlwraith CW. Evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction or bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis. J Orthop Res. 2009;27:1675 - 1680.

[97] Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. PLoS One. 2008;3:e1886.

[98] J M Lamo-Espinosa, G Mora, J F Blanco, et al. Intra-Articular Injection of Two Different Doses of Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Versus Hyaluronic

附录

云南农业大学生命科学伦理审查申请表

受理编号：202204006　　　　申请日期：2022年4月27日

<table>
<tr><td rowspan="11">申请人填写的相关信息</td><td colspan="2">申请单位：云南农业大学</td><td colspan="3">申请人(老师)：严玉霖</td></tr>
<tr><td colspan="5">项目名称：BMSCs对骨关节炎的临床治疗效果研究</td></tr>
<tr><td colspan="5">经费来源：校企合作项目“犬干细胞系列产品的研发与应用”</td></tr>
<tr><td colspan="5">执行期限：2022年1月1日到2023年12月30日</td></tr>
<tr><td rowspan="5">所需动物情况</td><td>品种品系：中华田园犬</td><td colspan="3">周龄或体重：8月</td></tr>
<tr><td>等 级 ：☑普通级</td><td>☐清洁级</td><td>☐SPF级</td><td>☐无菌级</td></tr>
<tr><td colspan="4">数量及性别：18只</td></tr>
<tr><td colspan="4">实验动物来源：昆明某犬场</td></tr>
<tr><td colspan="4">动物实验地点：云南农业大学</td></tr>
<tr><td colspan="5">项目内容概述，包括项目涉及动物相关具体实验目的、方法、观测指标、实验中动物处死及尸体处理的方法，申请人是否受到相应的培训，获得相应的资质和技能等。(可附页)
实验目的：通过碘乙酸钠复刻骨关节炎模型，观察常规治疗药物维他昔布和骨髓间充质干细胞治疗对骨关节炎疗效相比较，为临床治疗骨关节炎提供理论依据和技术支持。
实验方法：通过碘乙酸钠复刻骨关节炎模型，在建模过程中通过犬只日常行为步态观察、CBC观察、DR 观察、CRP观察模型是否建立成功。在治疗过程中对比常规药物治疗和干细胞治疗，判断干细胞治疗的可行性。
测定指标：CBC指标、全血样本中cCRP的含量、DR影响学观察、HE染色切片、关节炎Lequesne评分。
实验中动物处死及尸体处理的方法：实行空气栓塞法处死，处死的动物交学校动物中心处理，整个实验过程符合动物福利要求。</td></tr>
</table>

承 诺：

本人承诺该项目符合实验动物福利和伦理的要求，实验过程严格遵守云南农业大学生命科学伦理委员会相关要求，严格遵守国家和云南省实验动物福利伦理和生物安全相关法律规定，随时接受云南农业大学生命伦理委员会的监督与检查。

申请人签名：严玉霖　　　　联系电话：13211720918

学院部门审核：

同意

学院部门负责人签字：[illegible]　　　　学院部门盖章：云南农业大学动物医学院

云南农业大学生命伦理委员会审核：

经审核，该项目符合要求，同意开展研究。

负责人签名：[illegible]　　　　(盖章)：云南农业大学生命科学伦理委员会

2022 年 4 月 27 日

注：本申请表一式2份，申请人、伦理委员会科技处办公室各一份。

致谢

凡是过往，皆为序章，行文至此，思绪繁杂，全文将至，落笔为终，两年的研究生生涯转瞬即逝，回首两年光阴，满眼繁华，目光所及，皆是回忆，纵有万般不舍，皆是感恩。

感谢父母二十余载的养育之恩，感谢他们在我求学之路上的无私奉献与默默付出，教导养育，爱抚之恩，无以为报，只当努力奋进，努力成为你们的骄傲。父母永远是我最坚强的后盾，唯愿父母身体健康，万事如意，平安顺遂。

感谢我的导师严玉霖教授，小动物诊疗是我非常热爱的专业，感谢我的导师能给我提供这个平台，同时也感谢医院的医生对我的悉心教导。还记得一开始来到宠物医院时的慌慌张张不知所措到现在的从容应对，流畅沟通，我真的学到了很多很多宝贵的知识和经验。感谢我的导师在学习上的耐心教导，在论文写作中，从开题、初稿到定稿，严老师于百忙之中对我的论文悉心指导，同时我也要感谢教研室的高洪教授，感谢高老师在每次组会上给出的宝贵意见。

感谢我的挚友，即使他们每天都忙于工作，但是在我需要他们时总能第一时间出现在我身边。感谢同门周波和李函霖，不管在学习工作还是生活中因为有你们让我觉得原本艰难枯燥的时刻也变得有趣了许多，你们见过我糟糕的一面但依然愿意接受我，见过我虚弱的一面也愿意陪伴我；感谢严涵师姐不遗余力的教我怎样写论文，怎样分析数据，在严涵师姐的耐心指导下每次我都会有新的收获；感谢昂艳芬师姐每次都愿意牺牲自己的休息时间加班加点的带我做实验，教我做检测报告；感谢同门张学峰在学习工作上对我的帮助，你就是我们试验最坚固的后勤保障，有了你的帮助我们的试验才能顺利推进；感谢杨晨对我试验上的无私帮助，让我可以更专心完成我的毕业论文；感谢313实验室的伙伴大家一起相互学习，相互进步。

201的伙伴，我们朝夕相处，以梦为马，期许未来。希望我们都能无愧于自己的努力，永远保持热爱，奔赴山海，顶峰相见。201我们后会有期，祝大家前程似锦。

读书其实是很苦的的事，但还好，“我们一日日度过的所谓日常，实际上可能是接连不断的奇迹”，未来的人生道路，总会四处碰壁。唯有坚定不移为之拼搏，愿我不负众望，披荆斩棘，万丈光芒！